

PCT/JP99/05983

28.10.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/5983

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年10月30日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第310422号

出願人

Applicant(s):

株式会社医学生物学研究所

REC'D 20 DEC 1999

WIPO

PCT

E1

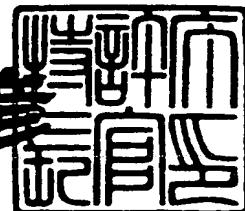
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特平11-3083771

【書類名】 特許願

【整理番号】 M3-007

【提出日】 平成10年10月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 チオレドキシンレダクターゼII

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社医学生物学研究所内

【氏名】 田路 真悟

【発明者】

【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社医学生物学研究所内

【氏名】 矢野 実

【発明者】

【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社医学生物学研究所内

【氏名】 玉井 克之

【特許出願人】

【識別番号】 390004097

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】チオレドキシンレダクターゼⅠⅠ

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項2】配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを持つチオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、チオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項4】配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、XIAP結合活性を有するタンパク質。

【請求項5】配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、XIAP結合活性を有するタンパク質。

【請求項6】請求項1-5のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項7】請求項1-5のいずれかに記載のタンパク質をコードするcDNA。

【請求項8】配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基酸配列からなる、請求項7に記載のcDNA。

【請求項9】請求項7または8に記載したDNAが挿入されたベクター。

【請求項10】請求項9のベクターを保持する形質転換体。

【請求項11】請求項10の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1-5のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項12】請求項7に記載のcDNA若しくはその一部に対するアンチセンスDNA。

【請求項13】請求項7に記載のcDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つオリゴヌクレオチド。

【請求項14】以下に示す第1エキソンまたは第2エキソン、および第3—第19エキソンを含み、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つタンパク質をコードするDNA。

第1エキソン：配列番号：18

第2エキソン：配列番号：19

第3エキソン：配列番号：20

第4エキソン：配列番号：21

第5エキソン：配列番号：22

第6エキソン：配列番号：23

第7エキソン：配列番号：24

第8エキソン：配列番号：25

第9エキソン：配列番号：26

第10エキソン：配列番号：27

第11エキソン：配列番号：28

第12エキソン：配列番号：29

第13エキソン：配列番号：30

第14エキソン：配列番号：31

第15エキソン：配列番号：32

第16エキソン：配列番号：33

第17エキソン：配列番号：34

第18エキソン：配列番号：35

第19エキソン：配列番号：36

【請求項15】配列番号：37で示される請求項14のDNA。

【請求項16】配列番号：18—配列番号：36のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列にハイブリダイズするDNAであって、ヒト染色体22q11.2に特異的にハイブリダイズしうるDNA。

【請求項17】配列番号：37に記載の塩基配列のうち、配列番号：18—配

列番号：36に記載された塩基配列を除く部分、またはその一部とハイブリダイズしうるDNA。

【請求項18】下記の工程を含む、XIAPとその結合因子との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、請求項2に記載のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、請求項2に記載のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった請求項2に記載のタンパク質の量を決定する

【請求項19】下記の工程を含む、チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質を請求項1-3に記載のタンパク質と接触させる工程、および

(b) 請求項1-3に記載のタンパク質のチオレドキシンレダクターゼ活性の変化を観察する工程

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つ新規なタンパク質をコードする遺伝子、ならびにこのタンパク質そのものに関するものである。このタンパク質は、アポトーシス、がん化、あるいは炎症等のシステムに密接に関連している可能性が高く、治療薬や診断マーカーの研究材料として幅広い応用が期待される物質である。

【0002】

【従来の技術】

ウイルスの感染があったとき、宿主側の細胞がアポトーシスを起こす現象が知られている。この現象は、感染細胞を生体から排除しようとする防御機構のひとつと考えられている。これに対してウイルス側は、自身が増殖するための時間を稼

ぐためにアポトーシスの抑制システムを備えている。すなわち、ウイルスが產生するアポトーシス阻害タンパク質(Inhibitor of Apoptosis protein: IAP)は、宿主のアポトーシスを阻害する抗アポトシスタンパク質のひとつである。その後、IAPはウイルスだけでなく高等動物においてもそのホモログの存在が確認された。ヒトのIAPホモログは、これまでに HIAP 1、 HIAP 2、 および XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)が報告されている。そのうち HIAP 1と HIAP 2は、 TRAF2 (TNFR associated factor 2)と結合することが明らかにされた(Cel 1 83(7): 1243-52. 1995., Proc Natl Acad Sci U S A 94(19): 10057-62. 1997)。一方 XIAPに結合する因子は同定されていない。ヒトにおけるアポトーシスの制御機構に関与する XIAP の機能解析を進めるには、その結合因子を同定する必要がある。

一方、チオレドキシンレダクターゼ（以下、Trxと省略する）については次のようなことが明らかになっている。すなわち、チオレドキシンの生成を通じたDNA転写機構への関与と、がんの増殖への関与である。これまでに報告されている、知見を以下にまとめた。

【0003】

チオレドキシンレダクターゼ ; Trx(EC 1.6.4.5)はピリジンヌクレオチドージスルフィドオキシドレダクターゼ ファミリーの 1つである。このファミリーには、グルタチオンレダクターゼ、リポアミド デヒドロゲナーゼ、トリパノチオニン レダクターゼ、水銀イオン レダクターゼや NADPH ペルオキシダーゼが含まれる。これらのタンパク質は2量体を形成し、ジスルフィド結合をレドックス活性中心に持つ。フラビンアデニジヌクレオチド（以下、FADと省略する）を補酵素とし、還元型ニコチンアミドアデニジヌクレオチドリン酸（以下NADPHと省略する）を利用し基質を還元する。チオレドキシンレダクターゼはNADPHをNADP⁺に酸化し、同時に基質である酸化型チオレドキシン(-S₂)を還元型チオレドキシン(-SH)₂に変換する（1）。還元型チオレドキシンはタンパク質のジスルフィド(S-S)結合を還元し、自身は酸化型チオレドキシンになる（2）。なお、以下チオレドキシンはTrxと省略する。





Trxはレドックススタンパク質であり、生体内で還元状態を作り出す電子供与体として重要な作用を担っている。例えば、リボヌクレオチドレダクターゼ、メチオニンスルホキシドレダクターゼ(Annu. Rev. Biochem 54: 237-71. 1985.)、ビタミンKエポキシドレダクターゼ (Biochem. Biophys. Res. Commun., 155(3):1248-54. 1988.)などの酵素の電子供与体である。またタンパク質のホールディングを触媒し、転写因子のDNA結合能を決定している。TrxによってDNA結合能が制御されている転写因子には、以下のような物質が知られている。

NF- κ B (J. Biol. Chem. 268(15): 11380-8. 1993.) (Nucleic Acids Res. 20(15) : 3821-30. 1992.),

TFIIC,

BZLF1(Oncogene 6(7): 1243-50. 1991.)

グルココルチコイド、

p53

また転写因子AP-1はRef-1によって還元されDNA結合能を有するが、このRef-1はTrxを介して還元される。

【0004】

一方、TxRは、抗がん剤のターゲットとしても注目されている。たとえば分泌型Trxはサイトカイン様の作用を持つことが報告されており、特に還元型Trxは細胞増殖に必須であることが報告されている。この還元型Trxを生成するのがTxRである。興味深いことに、ある種の癌ではTrxの血中濃度が上昇している事が報告されており、TxRの蛋白量も増加していると報告されている。Trxのレドックス活性中心に変異を挿入し、癌細胞に過剰発現させたところ癌細胞の増殖がほぼ完全に抑制されたとの報告もある。このような背景から、癌細胞の増殖を停止させるために、TxRに対する阻害剤のスクリーニングが最近活発に行われている。抗癌剤であるキノンやニトロソウレア、細胞増殖を停止し、分化誘導促進剤であるレチノイン酸は、TxRを阻害する作用を合わせ持つ。

【0005】

さて、TxRは、必須微量元素の一つであるSe (セレン) をSecys (セレノシステ

イン)として含有するタンパク質である。興味深いことにSecysは翻訳されうる21番目のアミノ酸で、終止コドンUGAによってコードされるというユニークな生合成機構を持っている。Secysは放射線防御作用や、抗癌作用を有することも報告されている。Secys含有タンパク質としてこれまでに、活性酸素種ヒドロペルオキシド(-OOH)をグルタチオンやTrx依存的に還元消去するグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、甲状腺ホルモン(チロキシン)前駆体T4を活性型T3に変換するI型テトラヨードチロニン脱ヨード酵素、また機能が良くわかっていないものとして、10個のSecysを含有するセレノプロテインPや、筋肉中に存在する低分子量のSecys含有タンパク質セレノプロテインWが報告されている。すでに報告されているヒトTxRはCys-Secys-Gly-終止コドン(UAA)というアミノ酸配列でSecysをコードすることが報告されている。最も研究が進んでいる牛のTxRをカルボキシペプチダーゼYで処理し、C-末端のSecysを除去したところ、活性がなくなったことから、このC-末端のSecysは活性に必須である事が報告されている(Zhong, L., E. S. Arn-er, et al. (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. J Biol Chem 273(15): 8581-91.)。新しいセレノタンパク質の構造が明らかにされれば、セレノタンパク質の研究に貢献するものと思われる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、XIAP結合タンパク質とこれをコードするDNAの単離を課題としている。更に本発明は、新規なヒトに由来するTxR活性を有するタンパク質と、それをコードするDNAの単離を課題としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、酵母2ハイブリッド法(yeast two hybrid system)を用いてXIAP結合蛋白質の探索を行った。その結果、ヒト胎盤cDNAライブラリーの中からXIAP結合蛋白質をコードする遺伝子の単離に成功した。そして、この遺伝子によってコードされるタンパク質がTxR活性を持つことを見出し、本発明を完成した。す

なわち本発明は、以下のタンパク質、これをコードするDNA、およびそれらの製造方法と用途に関する。

[1] 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

[2] 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを持つチオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

[3] 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、チオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

[4] 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、XIAP結合活性を有するタンパク質。

[5] 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、XIAP結合活性を有するタンパク質。

[6] [1] - [5] のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

[7] [1] - [5] のいずれかに記載のタンパク質をコードするcDNA。

[8] 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基酸配列からなる、[7]に記載のcDNA。

[9] [7] または[8]に記載したDNAが挿入されたベクター。

[10] [9] のベクターを保持する形質転換体。

[11] [10] の形質転換体を培養する工程を含む、[1] - [5] のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

[12] [7] に記載のcDNA若しくはその一部に対するアンチセンスDNA。

[13] [7] に記載のcDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つオリゴヌクレオチド。

[14] 以下に示す第1エキソンまたは第2エキソン、および第3-第19エキソンを含み、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つタンパク質をコードするDNA。

第1エキソン：配列番号：18

第2エキソン：配列番号：19

第3エキソン：配列番号：20

第4エキソン：配列番号：21

第5エキソン：配列番号：22

第6エキソン：配列番号：23

第7エキソン：配列番号：24

第8エキソン：配列番号：25

第9エキソン：配列番号：26

第10エキソン：配列番号：27

第11エキソン：配列番号：28

第12エキソン：配列番号：29

第13エキソン：配列番号：30

第14エキソン：配列番号：31

第15エキソン：配列番号：32

第16エキソン：配列番号：33

第17エキソン：配列番号：34

第18エキソン：配列番号：35

第19エキソン：配列番号：36

[15] 配列番号：37で示される[14]のDNA。

[16] 配列番号：18-配列番号：36のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列にハイブリダイズするDNAであって、ヒト染色体22q11.2に特異的にハイブリダイズしうるDNA。

[17] 配列番号：37に記載の塩基配列のうち、配列番号：18-配列番号：36に記載された塩基配列を除く部分、またはその一部とハイブリダイズしうるDNA。

〔18〕下記の工程を含む、XIAPとその結合因子との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、〔2〕に記載のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、〔2〕に記載のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった〔2〕に記載のタンパク質の量を決定する

〔19〕下記の工程を含む、チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質を〔1〕－〔3〕に記載のタンパク質と接触させる工程、および

(b) 〔1〕－〔3〕に記載のタンパク質のチオレドキシンレダクターゼ活性の変化を観察する工程

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明者らが得た新規なタンパク質TxRII α およびTxRII β のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：2および配列番号：4に、そしてそれをコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1および配列番号：3にそれぞれ示した。なお、以降本明細書においてはTxRII α とTxRII β の両方を同時に含む用語としてTxRIIsを用いることとする。このアミノ酸配列は、ヒト胎盤のcDNAライブラリーをもとに、2ハイブリッド法を応用してスクリーニングし、構造決定した新規な遺伝子に基づいて推定した配列である。2ハイブリッド法は、タンパク質の相互作用を高い感度で確認するための方法である。その原理については実施例中で触れるように、マークー遺伝子の発現を指標に、相互作用するタンパク質の組み合わせをスクリーニングする方法である。本発明者らは、XIAPに対する結合活性を持った物質の探索にこの方法を応用して新規な因子を発見し、その構造を明らかにした。

【0009】

本発明によって提供されるTxRIIsをコードする遺伝子の染色体上の位置は、22

q11.2であることが確認された。TxRIIsはいずれもこの領域の70kbpの中に19のエキソンに分かれて存在していた。染色体上へのマッピングはデータベースの検索によって行ったが、染色体のこの位置に、TxR活性を持ったタンパク質の遺伝子が存在していることはまったく知られていなかった。TxRII α とTxRII β とは、2番目のエキソン以降はまったく同じ構造を持つことから、TxRIIのオルターネイティブスプライシングフォームであると断定した。すなわち、TxRII α の1番目のエキソンが下記の第1エキソン（配列番号：18）となっており、TxRII β の1番目のエキソンは第2エキソン（配列番号：19）となっている。両者の2番目のエキソン以降は、第3エキソン（配列番号：20）－第19エキソン（配列番号：36）で共通である。

【0-0-10】

興味深いことにこのTxR II遺伝子の近傍には、Di George症候群や神経線維腫症などの原因遺伝子がマップされており我々の発見したTxR IIIsも何らかの遺伝病に関与している可能性を否定できない。更に注目すべきことにTxR II α のエキソン1は、カテコール- α -メチルトランスフェラーゼ（EC 2.1.1.6、以下COMTと省略する）のプロモーター領域に重なっていた。またCOMTも染色体上22q11.1→11.2マップされており、その転写方向はTxR IIに対して逆向きであった。つまりTxR II α が転写された場合、COMTのmRNAに対してアンチセンスに作用して、COMTの発現を阻害する可能性が示唆された。これが精神分裂症やパーキンソン病の原因である可能性もある。またこの事実から、TxRII α のエキソン1のセンス鎖DNAを過剰発現させることによって、あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドを、またはセンスの核酸アノログを投与することで、効率的にCOMTの転写を阻害できると考えられる。

【0011】

本発明によって提供されるゲノムDNAにおけるエキソンとインtronの位置に関する情報は、これらの疾患と遺伝子異常との関連性について研究を進める上で不可欠である。またこれらの遺伝子異常を診断するためのプローブの提供を可能とするものもある。ゲノム上に占める、各エキソンの位置について表1に示す。なお、以下に示す位置を示す番号は配列番号：37に示したゲノムの塩基配列

における5'末端を1としたときの番号である。更にこれらの情報に基づいて、たとえば各エキソンに特異的にハイブリダイズするDNAは、イントロン部分の増幅のためのプライマーとして利用することができる。逆に配列番号：37に記載した塩基配列のうち、各エキソンを除いたイントロン領域にハイブリダイズするDNAは、PCRによるエキソンの増幅に利用される。このようなプライマーは、イントロンやエキソンの異常を知るために不可欠なツールである。遺伝子疾患にはタンパク質をコードする領域の異常のみならず、イントロンの異常によってスプライシングが正しく行えないことが原因となっているケースも存在することから、このようなプライマーは遺伝子疾患の解明に有用である。更に、エキソンにハイブリダイズすることができるDNAはプローブとして有用である。特にこれらのDNAの中で染色体22q11.2に特異的にハイブリダイズするDNAは、配列番号：37に示す本発明によるゲノムDNAのクローニングのためのプローブとして有用である。すなわち、ヒトのジェノミックライブラリーをソースとしてこれらのプローブでスクリーニングを行えば、配列番号：37に示すゲノムDNAの単離が可能である。プローブやプライマーとして利用する場合、本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、ストリン杰ントな条件下でのハイブリダイズを達成するために少なくとも15ヌクレオチドから構成され、望ましくは15-200ヌクレオチド、より望ましい条件としては25-100ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドとする。

【0012】

【表1】

エキソン	塩基番号	スプライシング部位の構造		配列番号
		3'側	5'側	
Exon 1	1- 103	agcag/GTA		1 8
Exon 2	9247- 9446	ccaaag/GTG	CAG/caggtc	1 9
Exon 3	10706-10774	ggagg/GTA	CAG/ccgccc	2 0
Exon 4	22205-22261	ccaaag/GTA	CAG/gcacc	2 1
Exon 5	22800-22944	gactg/GTA	CAG/gagga	2 2

Exon 6	23587-23661	gacag/GTA	CAG/aaaag	2 3
Exon 7	25961-26039	aagag/GTG	CAG/attct	2 4
Exon 8	26529-26591	cgcac/GTG	CAG/atcga	2 5
Exon 9	30358-30428	aaaac/GTA	CAG/gttgg	2 6
Exon 10	43016-43035	cagct/GTA	CAG/atgtg	2 7
Exon 11	43954-44045	accag/GTA	CAG/caaat	2 8
Exon 12	46503-46677	catag/GTA	CAG/gtcga	2 9
Exon 13	58623-58759	tggag/GTA	AAG/gggcg	3 0
Exon 14	61367-61462	acaat/GTG	CAG/gttct	3 1
Exon 15	61813-61905	ttgag/GTG	CAG/gtcta	3 2
Exon 16	63647-63718	taaaag/GTG	CAG/atggg	3 3
Exon 17	63897-63994	atcaa/GTA	CAG/gtgtg	3 4
Exon 18	64850-65044	cccag/GTA	CAG/gatgg	3 5
Exon 19	66277-66566	-		3 6

【0013】

配列番号：2で示されるアミノ酸配列は、データベース検索によると公知のヒトTxRに対して55%の相同性を示した。またヒトグルタチオンレダクターゼに対しては38%の相同性を示した。特に、レドックス活性中心、FAD結合領域、NADPH結合領域、セレノシステイン活性中心においては完全に同じに保存されていた。本発明によるTxRII α と、公知のTxRとのアミノ酸配列のアライメントを図1に示した。これらのデータに基づいて本発明者らは配列番号：2のアミノ酸配列を持つタンパク質をTxRII α と名づけた。しかし公知のヒトTxRにはXIAPとの結合活性が見られないことから、本発明の蛋白質は新規である。またアミノ酸配列においても、両者のホモロジーは60%に満たない。したがって、両者は明らかに異なった蛋白質であり、ヒトTxRが本発明によるTxRII α やTxRII β の構造や機能を予測させるものではない。

【0014】

1995年に報告されたヒトチオレドキシンレダクターゼは3'側に存在する非翻

訳領域（以下3'UTRと省略する）にAUUUAという配列を含むことが報告されている。このAUUUAは、mRNAの不安定性に寄与していると考えられ、この配列を3'UTRに含むことでmRNAが素早く分解されることが報告されている。このような配列は、サイトカインやプロトオンコジーンにおいても報告されており、そしてこれらのタンパク質が刺激により瞬時に増加し、消失することは周知のことである。これらの事実から推察すると、先に報告されたヒトチオレドキシンレダクターゼは、ある何らかの刺激によって一時的に転写翻訳され、その後速やかに分解され、その作用はごく一時的なものに限られると考えられる。それに対し、本発明のTxRIIsの3'UTRにはこのような配列が存在せず、どちらかといえばTxRIIsが恒常的に生体内のレドックス制御に関与していると考えられる。従ってTxRIIsの阻害剤や促進剤は、これまでに報告されているTxRに対する阻害剤とは、特異性、阻害効果、治療薬として全く異なるものとなる可能性が大きいと考えられる。したがって、本発明によって明らかにされたTxRIIsに関する知見は、生体内のレドックス制御に関する薬剤の開発において大きな意味を持つものである。

【0015】

本発明によるタンパク質は、配列番号：2や配列番号：4に明らかにされたもののみならず、同等の生理活性を持つ変異体をも含むものである。すなわち本発明は、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなりX1AP結合活性を有するタンパク質すべてを含む。あるいはまた、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、しかも望ましくは全体として前記アミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを備え、TxR活性を有するタンパク質すべてを含む。

【0016】

配列番号：2または配列番号：4として記載したアミノ酸配列からわかるように、本発明によるTxRIIsはセレノシステインを分子内に含むセレノ蛋白質である

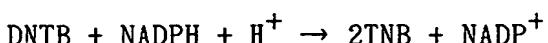
。一方、既に報告されているヒトTxRはCys-Secys-Gly-終止コドン(UAA)というアミノ酸配列でSecysをコードすることが報告されている。しかも、ウシTxRではこのC末端のCys-Secys-Glyという配列がTxRの活性発現に必要な領域とされている。したがって本発明によるヒトTxRIIsにおいても、TxRの活性発現にこの領域が重要な意味を持つことが推測される。

【0017】

生理活性を維持しながらアミノ酸配列に変異を加える方法は公知である。たとえば、ランダム突然変異を用いて変異体を作製する方法としてchemical mutagenesis法(Myers RM, et al. Methods Enzymol., 1987;155:501-527)が知られている。この方法では、まず注目している遺伝子の1本鎖DNAに塩基修飾試薬を加えてランダムに変異を導入する。次いで得られた1本鎖DNAを鋳型として、PCRにより適当なプライマーを使って2本鎖DNAを合成しクローニングする。変異体のライブラリーから所望の活性を持った発現産物を与えるクローンを選択すれば、目的とする変異体を得ることができる。他方、標的塩基を決めて変異体を作成する方法としては、突然変異オリゴヌクレオチドプライマーを使って、注目している遺伝子を鋳型にPCRを行うことで変異を導入する方法(Ito W, et al, Gene 1991 Jun 15;102(1):67-70)も公知である。なおアミノ酸配列の変異は人工的な操作のみならず、自然な状態でも生じることがある。本発明における変異体とは、TxR活性、あるいはXIAP結合活性を維持している限り、このような自然に生じた変異体も含むものである。

【0018】

TxR活性を確認する方法としては、たとえば次の2つの方法が知られている(Holmgren, A. et al. Methods Enzymol. 252:199)。まず、5,5'-ジチオビス(2-ニトロベンゾイックアシッド)[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid;DTNB)のような適当なSH指示薬を用い、TxR活性によって生じる5-メルカプト-2-ニトロベンゾイックアシッド(5-mercapto-2-nitrobenzoic acid;TNB)を412nmのチオールの吸収で測定する方法が公知である。この反応は以下のように示される。



【0019】

TxR活性のもう一つの指標は、TxR活性によって生じた還元型TrxがインシュリンのSS結合を切断するので、このときに生じる変化を追跡して酵素活性を知る、いわゆるインシュリンアッセイと呼ばれる手法である。指標となる変化には、補酵素NADPHの酸化による340nmの吸収の減少や、インシュリンの還元に伴って生じるチオール基の412nmにおける吸収が利用される。TxRによる還元型Trxの生成過程については既に述べたとおりである。

【0020】

一方、XIAP結合活性については、配列番号：2または配列番号：4に記載したアミノ酸配列を持つ天然型のTxRII α あるいは β を基準として、その結合活性と機能的に同等なものであれば良い。機能的に同等な物質のスクリーニング方法として、具体的にはたとえば以下のような方法を示すことができる。すなわち、XIAPとその結合物質との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、次の工程(a)または(a)',および(b)を含む方法である。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、本発明のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)',スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、本発明のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった本発明のタンパク質の量を決定する

より具体的には、実施例7-5) 阻害剤アッセイとして示した方法に準じた方法を示すことができる。候補化合物の希釀系列を試料とし、希釀系列依存的に吸光度の低下が観察されれば、その候補化合物には結合阻害活性があると判断される。あるいはまた、コンビナトリアルケミストリー(combinatorial chemistry)を応用することもできる。すなわち、候補化合物のライブラリーを用意し、これに本発明のタンパク質をXIAPとともに加えて、候補化合物に結合するXIAPを追跡すれば、TxRIIsの拮抗阻害物質をスクリーニングすることができる。逆に、候補化合物に結合するTxRIIsを指標とすれば、TxRIIsのXIAPに対する結合をブロックする化合物をスクリーニングすることになる。

【0021】

本発明によるスクリーニング方法において、前記本発明のタンパク質とは、XIAPとの結合活性ドメインを持つものであれば良い。すなわち、必ずしも配列番号：2や配列番号：4に示すアミノ酸配列を持った完全な分子でなくても良い。候補化合物や本発明のタンパク質の結合を観察するためには、これらのタンパク質を観察可能な分子で修飾しておく。観察可能な分子としては、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、および酵素活性物質等を挙げられる。前記コンビナトリアルケミストリーを応用した場合には、候補化合物のライブラリーを固相上に固着した状態にしておくと、反応液の分離と洗浄に続く標識の測定までの操作を容易に行えるので便利である。

なおこれらの方は、本発明における変異体のスクリーニングに有用なばかりでなく、XIAPと本発明のタンパク質との結合を阻害する化合物の一般的なスクリーニング方法として利用することができる。このスクリーニング方法を通じてスクリーニングされた化合物は、XIAPが関与するシグナル伝達系を制御しうることから、本発明によって提供されるタンパク質、その抗体、類似物質などには、アポトーシス促進を通じてがんの抑制やウイルス感染細胞における細胞死の誘導等の効果が期待できる。

【0022】

加えて、本発明のTxRIIsを利用し、その酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法が提供される。この方法は、以下の工程によって構成される。

- (a) スクリーニングの対象となる候補物質をTxRIIsと接触させる工程、および
- (b) TxRIIsのTxR活性の変化を観察する工程

このスクリーニングに用いられるTxRIIsは、必ずしも完全な分子である必要はなく、TxRIIsの酵素活性を維持する断片を利用することもできる。TxR活性の測定は、前記のような方法に基づいて行えば良い。TxRIIsの構造が公知のTxRIとは異なっていることから、一方の活性に影響する化合物が他方に作用するとは限らない。したがってTxRIIsの酵素活性に影響を与える物質をスクリーニングする方法は、TxRIIsの酵素活性に特異的な阻害剤や活性化剤を明らかにするために、あ

るいはTxRIIsとTxRIに同じように作用する化合物を得るために不可欠な技術である。

TxRが生体内のレドックスを制御していることから、本発明によるスクリーニング方法に基づいて得ることができるTxRIIsの阻害剤には、抗がん剤や自己免疫疾患の治療剤としての用途が期待できる。たとえば、自己免疫疾患であるリウマチの一般的な治療薬として利用されている有機金化合物は、セレノプロテイン、中でもTxRの阻害活性が高いとされている。したがって、TxRIIの阻害作用を持つ化合物には、類似の薬理活性を期待できる(Stephan Gromer et al., J.Biol.Chem. Vol.273, No.32, 20096-20101, 1998)。また、TxRの活性阻害を通じて薬理活性を期待するのであれば、公知のTxRのみならずTxRIIに対しても有効な化合物を選択する必要があることから、本発明によって提供されるTxRIIの活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法は有用である。

【0023】

本発明のタンパク質は、TxRII α 、あるいは β を発現している細胞から抽出・精製することによって得ることができる。細胞には、目的とするタンパク質を高度に発現しているものを選択するのが有利である。目的とするタンパク質をコードするDNAの塩基配列が与えられているので、この配列に基づくプローブを使って、標的遺伝子を高度に発現している細胞株をスクリーニングする方法は当業者が日常的に行っている。実施例に示すように、本発明によるTxRIIsは、多くの培養細胞が発現しているので、これらの培養細胞を原料とすれば良い。また、細胞培養物から種々の抽出法やタンパク質の精製法を組み合わせて目的とするタンパク質を純化する方法も、当業者が経験的に選択することができる。具体的には、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イムノアフィニティクロマトグラフィーなど様々な精製方法が利用できる。

こうした天然材料からの精製とは別に、遺伝子工学的な手法によって本発明によるタンパク質を得ることもできる。たとえば配列番号：1や配列番号：3に示した塩基配列を基に、その翻訳領域を適当なベクターに組み込んで発現ベクターを構築する。そして、この発現ベクターを適当な宿主にトランスフェクトすれば目的のTxRIIを組み換え体として発現させることができる。

【0024】

加えて本発明は、前記本発明によるタンパク質をコードするcDNAを提供する。本発明が開示する配列番号：1または配列番号：3に示す塩基配列を持つDNAは新規である。本発明のcDNAは、たとえば配列番号：1または配列番号：3に記載した塩基配列に基づいて設計したプローブを使ってcDNAライブラリーをスクリーニングすれば、目的とする遺伝子を得ることができる。この他、配列番号：1または配列番号：3に記載した塩基配列を基にプライマーを合成し、cDNAライブラリーを鑄型としてPCRを行っても、本発明による遺伝子を得ることができる。プローブやプライマーの設計と調製は、本発明のcDNAの塩基配列に基づいて当業者に公知の方法で行うことができる。PCR用のプライマーにおいては、増幅しようとするセグメントの5'末端付近と、3'末端付近の配列を選択することになる。このときに各プライマーの5'側に制限酵素認識配列を附加しておくと、ベクターへの挿入に便利である。配列番号：1、あるいは配列番号：3に示した塩基配列は、いずれも約2kbpの長さを持っている。この程度の長さであれば、一組のプライマーを利用しcDNAを鑄型として1度のPCRで全領域の増幅が可能である。得られる増副産物は、電気泳動で確認することにより標的遺伝子の高感度な検出を可能とする。あるいは増副産物をベクターに組み込むことによって発現ベクターを構築することができる。実施例に用いた市販のライブラリーには、本発明によるTxRIIsの全長cDNAが含まれている。したがって、これを鑄型としてPCRを行えば本発明のcDNAを容易に得ることができる。あるいはTxRIIsを発現していることを示した各種細胞株のmRNAをもとにRT-PCRを行うことによって、本発明のcDNAを得ることができる。

【0025】

配列番号：1、または配列番号：3に記載した塩基配列に基づいて活性型のTxRIIsの発現ベクターを構築するときに、そのCDSと並んで重要な構成要素となるのが3'UTRである。3'UTRのうち、配列番号：1の1780-1909、そして配列番号：3の1883-2012に相当する部分（配列番号：5、130bp）は共通の塩基配列で構成されている。この部分が、セレノシスティンを含んだ完全な形のTxRIIsとして発現させるために必要となる。mRNAにおけるこの領域に相当する部分によって構成

されるステムループ構造により、通常は停止コドンであるUGAがセレノシステインに翻訳される。先に述べたとおり、セレノシステインはTxRの酵素活性に必須のアミノ酸と考えられている。したがって、本発明に基づく発現ベクターには、この領域を含む形でインサートを組み込む必要がある。ただし、本発明のTxRIIsにTxR活性を期待しないのであれば、この領域は必須ではない。たとえば、特定の領域のみからなるTxRIIsのドメインペプチドの発現を目的とするようなケースでは、必要なアミノ酸配列をコードする塩基配列のみを発現可能な形で組み込むことによって目的のタンパク質を得ることができる。このようにして得られるドメインペプチドには、TxRの酵素活性は期待できないが、たとえば、本発明によるTxRIIsを認識する抗体作成のための免疫原として利用することは可能である。あるいは、XIAPとの結合を担う領域を選択すれば、本発明に基づくXIAPとの結合活性を備えた変異体の作成を可能とする。

【0026】

本発明によるDNAは、配列番号：1および配列番号：3に示した塩基配列そのもので構成されるもののみならず、その変異体をも含む。本発明に基づくDNAの変異体とは、次の2つに大別される。すなわち、第一に、先に述べたアミノ酸配列に変異を持つ本発明によるタンパク質のすべてについて、それをコードする塩基配列を備えたDNAは、本発明に基づくDNA変異体に他ならない。この種の変異体をより具体的に説明すれば、TxRIIsとしての活性を維持する範囲内でアミノ酸配列に変異を加えた全ての変異体をコードするDNAは、配列番号：1あるいは配列番号：3にハイブリダイズすることができるかどうかとは無関係に本発明によるDNAに含まれる。通常1つのアミノ酸に対するコドンには複数の配列が対応している（縮重）ため、与えられたアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列には理論上は天文学的な数に上る種類の配列が想定できる。この理由により、本発明によるDNAの塩基配列は特定配列との相補性とは無関係に特定されなければならないのである。

【0027】

第2に、配列番号：1または配列番号：3とハイブリダイズすることができ、かつTxRIIsとしての活性を維持するタンパク質をコードするDNAは、本発明によ

るDNAに含まれる。ストリンジエントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。

変異体も含め本発明によるDNAの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。本発明において明らかにされたcDNAの塩基配列に基づいて、この塩基配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを得ることができる。本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、ストリンジエントな条件下でのハイブリダイズを達成するために少なくとも15ヌクレオチドから構成され、望ましくは15-200ヌクレオチド、より望ましい条件としては25-100ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドとする。このようなオリゴヌクレオチドは、プローブやプライマーとして利用される。与えられた配列をもとに、その配列に特異的にハイブリダイズするプローブを設定することは当業者が日常的に行っていることである。特異的なハイブリダイズを達成する塩基配列は、目的とする標的塩基配列に対して必ずしも完全に相補的である必要は無い。ストリンジエントな条件の元で、必要な特異性を達成できれば、配列の変異は許容される。設定された塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。プライマーとして利用する場合には、相補鎖の合成原理に応じて複数の領域を設定することができる。たとえばPCRのためのプライマーであれば、合成の対象となるセグメントの5'側と3'側の両端を規定する領域がプライマーとして選択される。本発明によるオリゴヌクレオチドは、基本的なPCRのみならず、RNAを鑄型とするRT-PCR、增幅領域をネストさせて高感度な検出を可能とするネステッドPCR、あるいはcDNAの合成等、様々な相補鎖合成反応に応用することができる。

【0028】

たとえばTxRIIsのcDNA増幅用プライマー、あるいは3'UTR増幅用のプライマーとして次の塩基配列を示すことができる。以下に示すTxRIIsのcDNA増幅用プライマーを用いれば、本発明によるTxRIIsを公知のTxRと識別することが可能で、後者のcDNAを特異的に増幅することができる。

T_XRII α の forward プライマー (配列番号 : 13) :

5' -ACGATGGCGGCAATGGCGGTG-3'

T_XR_{II}β の forward プライマー (配列番号 : 1 4) :

5' -ACCATGGAGGACCAAGCAGGT-3'

Type IIIs の reverse プライマー (配列番号 : 15) :

5' -TTACCCCTCAGCAGCCTGTCAC-3'

3' UTR増幅用forwardプライマー（配列番号：16）：

$5' - \text{GGGCGATCCCTGCAGGCCAGG} - 3'$

3' UTR増幅用reverseプライマー（配列番号：17）：

5' -CACACTTCAGAAAAAGTACCC-3'

[0029]

本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、TxRIIsの発現を抑制するアンチセンスDNAとしても利用することができる。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、複数の要因が存在する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。いずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制することも可能である。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もししくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、発現を抑制すべき細胞へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換すべき細胞が持つ内在性TxRIIs遺伝子(若しくはその相同遺伝子)またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有效地に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好みしくは90%、最も好みしくは95%の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少

なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスRNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。

【0030】

本発明は、本発明に基づくタンパク質を認識する抗体を提供する。本発明の抗体は、先に述べたような方法で得たタンパク質やその断片を公知の方法によって免疫することによって調製することができる。免疫に当たってはFCAのようなアジュバントを免疫抗原と混合し、適当な免疫スケジュールで免疫動物の皮下に免疫する。免疫動物には、TxRの構造がヒトとできるだけ異なっているものを選択すると高い免疫刺激を期待できる。抗体は、免疫動物の血清から精製したポリクローナル抗体のみならず、抗体産生細胞のクローニングによって得ることができるモノクローナル抗体とすることもできる。免疫動物の抗体産生細胞を回収し、クローニングを可能とする培養細胞株と融合させてモノクローナル抗体を產生する細胞株を樹立する方法は、当業者によって自明である。こうして得られる抗体は、本発明によるTxRの免疫学的な検出や、精製に利用することができる。

更に、異種動物由来のTxRIIsを認識する抗体産生細胞が持つ抗体の可変領域の遺伝子を利用し、これをヒト化することも可能である。すなわち、たとえばマウスの抗体可変領域にヒト抗体の定常領域を備えたキメラ抗体を遺伝子組み換えによって作り出すことができる。あるいは超可領域のみをヒト抗体のフレームワークに組み込んだ、いわゆるヒト化抗体(*humanaized antibody*)を得る方法も公知である。これらのヒト化した抗体は、ヒトに投与しても免疫学的な反応を起こしにくいので*in vivo*において安全に、しかも効果的に利用することができる。以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

【0031】

【実施例】

本発明において、汎用されている手法については全てJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに従って行った。

【0032】

1. XIAPのPCRによるクローニング

1-1) プライマー作製

ヒトのXIAP遺伝子全長を、PCR法を用いて単離するために、以下の2つのプライマーを合成した。

・5' プライマー (XIAP 2486 (32mer))

5'- GCG GGA TCC ATG ACT TTT AAC AGT TTT GAA GG -3'

* 5' 端3塩基(GCG)は制限酵素処理を円滑に行なうためのもの。

5' 端4塩基目から9塩基目まで(GGATCC)は制限酵素BamH I サイト。

・3' プライマー (XIAP 2482 (32mer))

5'- GCG CTC GAG CTA CTA TAG AGT TAG ATT AAG AC -3'

* 5' 端3塩基(GCG)は制限酵素処理を円滑に行なうためのもの。

5' 端4塩基目から9塩基目まで(CTCGAG)は制限酵素Xho I サイト。

1-2) PCR

ヒトT細胞由来Jurkat細胞由来のcDNAを錆型DNAとして用い、ヒトXIAP遺伝子全長をPCR法で増幅した。PCRは、GeneAmp PCR System 2400 (PERKINELMER)を用い、下記のプログラムで行った。

a) 94°C 5min.

b) 94°C 1min.、58°C 3min.、72°C 3min.を1サイクル

c) 94°C 1min.、65°C 1min.、72°C 2min.を35サイクル

d) 72°C 10min.

【0033】

1-3) pAS2-1ベクターへのPCR産物のクローニング

i) PCR産物の精製

PCR後、増幅されたDNA断片を 1 % アガロース電気泳動によって確認した。このDNA断片を制限酵素BamH I、Xho Iで処理した。制限酵素処理したDNA断片を 1 % アガロースで電気泳動後、切り出し、グラスマトリクス法 (BI0101社、GeneClea

n) により精製した。

【0034】

ii) ベクターの作製

pAS2-1ベクターは、CLONTECH社のMATCHMAKER Two Hybrid System（商品名）で用いられるbaitベクターで、GAL4-DNA-BD（GAL4蛋白質のDNA Binding Domain）をコードする配列の下流にマルチクローニング部位（MCS）が存在する。なお、2ハイブリッド法におけるbait（おとり）とは、未知の結合因子を探し出すためのプローブとして機能する既知のタンパク質を発現する側のベクターを意味する。GAL4-DNA-BDとPCR産物の翻訳フレームを合わせるため、このMCSの制限酵素 Nde IサイトをNde Iで切断後、常法により平滑末端とし、セルフライゲーションさせ2フレームずれたベクターpAS Δ NdeI(+2)を得た。これを制限酵素BamH I、Sal Iにより処理した断片を、PCR産物と同様の方法で精製した。精製したPCR産物、pA S2-1 Δ NdeIベクターの断片をライゲーションした。精製したPCR産物、pAS2-1 Δ N deIベクターはモル比が1になるよう混和し、T4 DNA ライゲースを用い16℃で1時間反応させた。

【0035】

iii) 大腸菌のトランスフォーメーション

常法(Hanahan, D. 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol. 166 : 557)によりコンピテント化された大腸菌株DH5 α に、ライゲーション反応液を加え、穏やかに混和し氷上に30分静置後、42℃温水中で90秒熱ショックを加え、再度氷上に2分静置し、SOC培地を加え37℃で1時間震盪培養した。、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLBプレートにスプレッドし、37℃で一晩培養した。

【0036】

iv) アルカリ-SDS法によるDNAの回収およびインサートの確認

プレートから複数のコロニーを拾い、LB-アンピシリン培地で37℃一晩培養した。培養した大腸菌から、アルカリ-SDS法を用いてプラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAを適当な制限酵素で切断し、アガロース電気泳動によりベクター内に目的のPCR産物が組み込まれていることを確認した。

【0037】

v) シークエンスの確認

回収したDNAをポリエチレングリコール沈殿法により精製し、ベクター内のPCR産物を、サンガー法に基づき蛍光シークエンサー (PERKINELMER) により確認した。これによりpAS Δ NdeI(+2)ベクターにヒトのXIAP遺伝子全長が組み込まれたpAS Δ NdeI(+2)-XIAP のプラスミドDNAを得た。

【0038】

2. 2ハイブリッドスクリーニング

細胞内情報伝達機構の解析や高度な細胞機構の研究において、タンパク質間の相互作用を検出することや、既知のタンパク質と相互作用する未知あるいは既知の分子を同定することは非常に重要である。2ハイブリッドスクリーニングシステムは、2つの遺伝子のコードするタンパク質の相互作用の検出、あるいはある遺伝子産物と相互作用する分子のクローニング方法として注目を集めている。この方法は2つの遺伝子産物をそれぞれ転写因子のDNA結合部位 (GAL4-DNA-BD) と転写活性化部位 (GAL4-AD) に融合させ、両者の相互作用を転写活性を指標にして検出する。GAL4-DNA-BD融合蛋白質とGAL4-AD融合蛋白質を酵母の核内で同時に発現させる。両者が相互作用する場合、GAL4プロモーターを上流に持つHIS3遺伝子、lac Z遺伝子の転写翻訳が起こることが期待される。すなわち両者の蛋白質の相互作用がある場合のみ、その酵母は、ヒスチジンを除いた寒天培地上で生育が可能になり、 β -ガラクトシダーゼ (以下、 β -Galと省略する) 活性がX-galを基質として検出可能になる。この様に2ハイブリッドスクリーニングシステムは、タンパク質を精製せずに2つの遺伝子産物の相互作用が酵母核内という *in vivo* の条件下で判定できるという優れた特性を有している。しかしながら相互作用を示さずにGAL4プロモーターからの転写を起すタンパク質のスクリーニングは不可能である。そこで、GAL4-DNA-BD融合蛋白質のみでlac Z遺伝子が発現しない、すなわち β -gal活性がないことを確認する事が非常に重要な事である。2ハイブリッドスクリーニングはCLONTECH社のMATCHMAKER 2ハイブリッド法 2を用い、実験方法は全てこのプロトコールに従った。

【0039】

2-1) pray用のライブラリーDNAの精製

CLONTECH社より購入したHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryをスクリーニ

ング用のライブラリーに用いた。このライブラリはpACT2ベクターで作製されており、GAL4-AD (GAL4蛋白質のActivation Domain) をコードする配列の下流にMCSがあり、このMCSにcDNA断片が挿入されている。2ハイブリッド法において、未知の結合因子を含むと思われるライブラリーをprayと呼ぶ。直径150mmのLBアンピシリンプレート100枚に1枚あたり約20,000個のコロニーを30℃で一晩培養し、菌体をLBアンピシリン液体培地で30℃で4時間培養した。集菌した大腸菌からプラスミドDNAをポリエチレングリコール沈殿法により回収精製した。

【0040】

2-2) 融合タンパク質の発現確認と β -gal活性がないことの確認

構築したpASΔNdeI(+2)-XIAPで酵母を形質転換し、XIAPがGAL4-DNA-BD融合蛋白質として発現すること、ならびにGAL4-DNA-BD融合XIAP(bait)が単独でGAL4プロモーターを活性化し、lac Z遺伝子が発現しないことを確認した。

【0041】

酢酸リチウム法(Gietz, D., Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. 1992, Improved method for high efficiency transformation of intact 酵母 cell s. Nucleic Acid Res. 20:1425)によりコンピテント化された酵母Y190に、pASΔNdeI(+2)-XIAPのプラスミドDNAを用いて形質転換した。形質転換により得られたコロニーを、SD/-Trp液体培地で30℃ 3日間培養した。培養後に酵母菌体を遠心分離により集め、尿素/SDS蛋白抽出バッファーを用いて常法(Printen, J. A. & Sprague, G. F., Jr. (1994) Protein interactions in the 酵母 pheromone response pathway : Step 5 interacts with all members of the MAP kinase cascade. Genetics 138 : 609-619)により酵母よりタンパク質を抽出した。SDS-PAGEによりタンパク質を泳動後、PVDFメンブレンに蛋白質をプロッティングした。anti-GAL4 DNA binding domain monoclonal antibody (CLONTECH社製) とanti-XIAP ポリクローナル抗体を用いたウエスタンプロットにより、GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質が発現していることを確認した。

【0042】

GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体を生

育させたプレートに、滅菌したナイロントランスファーメンブレン (Amersham社製、Hybond-N+) をのせ、コロニーをメンブレンにトランスファーした。このメンブレンを液体窒素に10秒間浸した後、室温に戻し、コロニーがついている面を上にし、Z-buffer / X-gal 溶液 (100ml Z-buffer (16.1g/L Na2HP04-7H2O、5.50g/L NaH2P04-H2O、0.75g/L KCl、0.246g/L MgS04-7H2O、pH7.0に調整)、0.27ml メルカプトエタノール、1.67ml X-gal 溶液 (20mg/ml X-gal in DMFA)) を浸した濾紙の上に置き、30℃で1時間以上静置した。この結果GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体は青くならなかった。すなわちGAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質単独ではGAL4プロモーターからの転写を活性化せず、2ハイブリッドスクリーニングシステムに使用可能であることが確認できた。

【0043】

2-3) 1次スクリーニング

GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体を大量培養し、酢酸リチウム法によりコンピテント化した。これを先に調製したHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Library で形質転換した。得られた形質転換体をSD/-Trp/-Leu/-His/+3-ATのプレートにストリークし、7日間 30℃で培養した。これにより、baitとpreyが結合しGAL4プロモータの下流にあるHis3遺伝子が発現しHis+になった酵母だけが生育しコロニーを生じる。用いたライブラリーのindependent clonesは 5×10^6 に対して実際にスクリーニングしたのは 72.5×10^7 であり約5倍量のスクリーニングが行えた。この1次スクリーニングでHis+になった酵母は82クローンであった。

【0044】

2-4) 2次スクリーニング； β -gal アッセイ

1次スクリーニングで得られたクローンにおいて、本当にbaitとpreyが結合しGAL4プロモータの下流遺伝子を発現させているかを調べるために、もう1つのGAL4プロモータの下流にあるlac Z遺伝子が発現しているかどうか、すなわち β -gal活性をもつかどうかを調べた。SD/-Trp/-Leu/-His/+3-ATの寒天プレートにナイロントランスファーメンブレンをのせ、このメンブレン上に1次スクリーニング

でHis+になった酵母82クローンを培養生育させた。コロニーリフトフィルターアッセイによる β -gal活性測定により、His+かつ β -gal活性を持つクローンを得た。この2次スクリーニングにより74個の β -gal活性を有するコロニーを得た。

【0045】

2-5) prayの配列決定

クリーニングで得られたクローンに挿入されているDNA配列を調べるために、酵母からプラスミドDNAを回収し大腸菌に移した。

まずHis+で、かつ β -gal活性を持つ酵母のクローンをプレートから搔き取り、SD/-Leu培地で一晩培養した。集菌後菌体を常法(Kaiser, P. & Auer, B. (1993) Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to E. coli. Bio Techniques 14 : 552)に従い処理し、酵母プラスミドDNAを回収した。

【0046】

HEPES-NaOHを用いてのコンピテント化されたエレクトロポレーション用の大腸菌HB101を、酵母から回収したプラスミドDNAでエレクトロトランスフォームした。エレクトロポレーション後、37°Cに温めておいたSOC培地を加え、37°Cで1時間震盪し回復培養を行なった。培養後、-Leuプレート(50 μ g/ml アンピシリン、40 μ g/ml プロリン、1mM 塩酸チアミン、-Leuドロップアウト溶液を含むM9プレート)にスプレッドし、37°Cで一晩培養した。大腸菌HB101はleuB変異を持っており、酵母から得られたプラスミドDNAのうち、leuB変異を相補できるLEU2遺伝子をコードするライブラリーベクターのみが大腸菌HB101をトランスフォームし、プレート上にコロニーを形成することができる。生育した大腸菌HB101からのプラスミドDNAをアルカリ-SDS法で抽出した。回収したプラスミドDNAを用い、大腸菌DH5 α をトランスフォームした。

【0047】

大腸菌DH5 α 内のpACT2ベクターのプラスミドDNAをアルカリ-SDS法により回収し、ポリエチレンギリコール沈殿法により精製した。サンガー法に基づき蛍光シーケンサーによりベクター内の遺伝子の塩基配列を確認した。これにより、新規遺伝子X19を得た。

【0048】

2-6) 再トランスマスクによる確認

精製したpACT2-X19のプラスミドDNAで酵母Y190をトランスマスクした後、 β -gal活性測定を行なうことにより、GAL4-AD蛋白質とX19との融合蛋白質単独ではGAL4プロモーターからの転写を起こさないことを確認した。また、pAS Δ NdeI(+2)-XIAPとpACT2-X19によってトランスマスクしたY190の β -gal活性測定、およびpAS-X19とpACT-XIAPによってトランスマスクしたY190の β -gal活性測定によりGAL4プロモーターからの転写が起こっていること、すなわちXIAPとX19が酵母核内で結合することを確認した。

【0049】

3. X19アミノ酸配列相同性検索

X19の機能をアミノ酸配列上から予測するために、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター及び京都大学化学研究所スーパーコンピューターラボラトリのwwwサービス (<http://www.genome.ad.jp>) を用いて、アミノ酸配列相同性検索を行なった。

【0050】

3-1) 配列相同性検索プログラムBLAST

ノンリダンダントアミノ酸配列データベースnr-aaを用いてのX19のアミノ酸配列に相同な配列の検索を行なった (blastp search)。その結果X19はhuman thioredoxin reductase、human glutathione reductaseにそれぞれ55%、38%のホモジーを有する新規遺伝子であった。更にhuman thioredoxin reductaseにおいて報告されている機能領域（レドックス活性中心、FAD結合領域、NADPH結合領域、セレノシステイン活性中心）が完全に相同に保存されていた（図1、配列1）。よって我々はX19をヒト・チオレドキシンレダクターゼII(human thioredoxin reductase II;TxRII)と命名した。

【0051】

4. TxRIIの全長cDNAの獲得

4-1) コロニーハイブリダイゼーションによる全長cDNAの獲得

Human Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryから、コロニーハイブリダイゼーションによりTxRIIの全長cDNAを獲得した。スクリーニングには、配列決定されたTxR

IIの部分配列からPCR法でDNA断片を増幅し、これをプローブとして用いた。

【0052】

i)コロニーハイブリダイゼーション用メンブレンの作製

Human Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryを希釈し、直径150mmのLB (ampicillin) プレート1枚当たり 4×10^4 個以上のコロニーが生育するようにまいた。これを12枚用意し、30°Cで一晩培養した。ハイブリダイゼーション用メンブレンにコロニーを移し、常法に従いコロニーハイブリダイゼーション用メンブレンを作製した。

【0053】

ii)プローブの作製

TxRIIのcDNAを鋳型に下記のプライマーを用いPCRでN末端側約500bpのDNA断片を得た。

TxRII-sF3 5' - TAT GAT CTC CTG GTG GTC - 3'

TxRII-sR2 5' - GTC ATC ACT TGT GAT TCC - 3'

増幅されたDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、グラスマトリクス法により精製した。精製したDNA断片は、DNAランダムラベリングキット (amersham社製、rediprime DNA labelling system) と [α -³²P] deoxy-CTP (ICN社製) で [³²P] ラベルされたプローブを作製し、スピンカラム (pharmacia社製、ProbeQuant G-50 Micro Column) で精製した。

【0054】

iii)ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、ハイブリボトルおよびハイブリオーブン（タイテック社製）を用いて行なった。DNAをクロスリンクさせたメンブレンは、ハイブリダイゼーションバッファー (10% PEG6000、1.5% SSPE、7% SDS) で65°C、1時間プレハイブリダイズした。 [³²P] ラベルされたプローブを煮沸し急冷した後、65°Cに温めたハイブリバッファーで希釈し、プレハイブリダイゼーションに用いた液と交換した。ハイブリダイゼーションは65°Cで一晩行なった。

【0055】

iv)洗浄とオートラジオグラフィー

0.1×SSC、0.1% SDSの洗浄液でハイブリダイゼーションバッファーを洗い、適宜サーベイメーターで洗いの程度を確認した。洗浄液のカウントが無くなるまで数回洗浄液を換え、完全にカウントが無くなったら、メンブレンにフィルムをのせ、オートラジオグラフィーにより陽性コロニーを検出した。

【0056】

v) ポジティブコロニーの単離

パスツールピペットによりポジティブコロニーを単離し、これを希釈倍率を変えて直径100mmのLB (ampicillin)プレートにまき、30℃で一晩培養した。以下同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、単一ポジティブコロニーを得た。これよりプラスミドDNAを回収しそのDNA配列を決定した。こうして決定した塩基配列が配列番号：1に示すTxRII α のcDNAである。

【0057】

4-2) PCRクローニングによる全長cDNAの獲得

2ハイブリッドで用いたHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryから、TxRII特異的なプライマーとライブラリーベクター特異的なプライマーを組み合わせてPCR法によるTxRII遺伝子の獲得を試みた。用いたプライマーの配列は、コロニーハイブリダイゼーションによって得られたクローンの塩基配列に基づき、以下のように設定した。

TxRII特異的プライマー1

5' - ACA GCT TCT GCC ATC TTC CTC -3'

TxRII特異的プライマー2

5' - AGA AGG TTC CAC GTA GTC CAC - 3'

ライブラリーベクター特異的なプライマー

5' - CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC - 3'

PCRは、TxRII特異的プライマー1とライブラリーベクター特異的なプライマーの組み合わせで、GeneAmp PCR System 2400 (PERKINELMER)を用い、下記のプログラムで行った。

a) 94℃ 5min.

b) 94℃ 30s、56℃ 30s.、72℃ 1min.30sを35サイクル

d) 72°C 10min.

PCR産物を1%アガロースで電気泳動後、切り出して精製し次のPCRのテンプレートとした。2回目のPCRはTxRII特異的プライマー2とライブラリーベクター特異的なプライマーの組み合わせで、下記のプログラムを行った。

a) 94°C 5min.

b) 94°C 30s、56°C 30s., 72°C 1min.30sを35サイクル

d) 72°C 10min.

PCR産物を1%アガロースで電気泳動後、切り出して精製しTopo TA cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングし、PCR産物のDNA配列をシークエンスした。

その結果約180bpの5'-非アミノ酸翻訳領域を含むcDNAが得られ、最初のメチオニン(Met)の直前にKozak consensusがある事などからこれが最初のMetであると断定した。しかしながらN末端側の配列は、酵母の2ハイブリッド法で得られたものと異なっていた。この遺伝子はTxRIIの2つ目のエキソン以降は全く同一であることから、TxRIIのオールターネイティブスプライシングフォームであると結論した。酵母の2ハイブリッド法で得られたものをTxRII α 、オールターネイティブスプライシングフォームをTxRII β と呼ぶことにした。TxRII β はTxRII α の2番目のエキソン以降は全く同一の遺伝子であった(配列番号: 3)。

【0058】

更にTxRIIsのcDNA塩基配列に基づいて公知のゲノムの塩基配列を検索したところ、22q11.2にマッピングされることが確認された。TxRIIsをコードする遺伝子は、いずれもこの領域の70kbpの中に18のエキソンに分かれて存在していた。この領域にXIAPとの結合活性や、あるいはTxR活性を持ったタンパク質をコードする遺伝子の存在は、まったく予想されていない。

【0059】

5. 抗TxRII抗体の作製

ヒトTxRII蛋白質に対する抗体を作製するために、免疫原としてGST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)蛋白質との融合蛋白質を精製し、マウスに免疫することで、抗TxRIIマウス抗血清を回収した。

【0060】

5-1) GST-TxRII α 融合蛋白質の発現

pACT2-TxRII α からTxRII α フラグメントを pGEX ベクター (pharmacia社製) にリクローニングし、pGEX-TxRII α を構築した。このpGEX-TxRII α でトランسفォームされている大腸菌 (DH5 α) をLB-アンピシリン培地で37°Cで一晩培養した。その培養液を新しいLB-アンピシリン培地に100倍希釀になるように加え 37°Cで培養した。培養液の濁度が 0.6 付近となったところでGST-TxRII α 融合蛋白質を発現誘導するために IPTG (isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.5mM になるように添加し、さらに4 時間37°Cで培養した。培養後遠心により集菌した。

【0061】

回収した菌体を氷冷した1% Tween- 20を含むPBSによく懸濁し、超音波破壊により菌体を完全に破碎した。破碎液を遠心し上清を、GSH-セファロース4Bカラム (pharmacia社製) に通してGST融合タンパク質をカラム吸着させた。カラムをWE buffer (10mM β -メルカプトエタノール、2mM MgCl、20mM Tris-HCl (pH7.5)) で十分に洗浄した後、G buffer (10mM GSH、50mM Tris-HCl, pH9.6) を用いてGST-TxRII α 融合蛋白質を溶出した。溶出液を50% glycerol / PBSで濃縮およびバッファーの置換を行なった。

【0062】

5-2) GST-TxRII α 融合蛋白質のマウスへの免疫、採血、反応性の確認

精製したGST-TxRII α 融合蛋白質とフロイト完全アジュバンドをエマルジョン化し、ネズミの腹腔内に注射した。この操作を毎週5週間続けたのち採血し、抗TxRII抗体を含む血清を回収した。この抗血清を使ったウエスタンブロッティング法により、免疫原、哺乳動物細胞で過剰発現させたTxRII、および各種培養細胞で反応性を確認した。

【0063】

6. ウエスタンブロッティング法(図2)

培養細胞より可溶性蛋白質を調製し、常法(M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248, 1976)に従いタンパク質濃度を測定し、1レーン当たり40mg タンパク質になるようにSDS-PAGEを行った。これを抗TxRII抗血清でイムノディテクションし

、各培養細胞株に内在するTxRII蛋白質の存在を確認した。この結果、各種培養細胞でTxRIIの発現が確認できた。なお図2において、70 kDa付近のバンドがTxRII α であり、55 kDa付近のバンドがTxRII β である。またマウスやラットの培養細胞ではTxRII β の発現が確認できなかった。試料とした培養細胞は次の11種である。

Raji	ヒトのパーキットリンパ腫由来の細胞株
Jurkat	ヒトのT cell 急性リンパ芽球性白血病由来の細胞株
HL60	ヒトの急性前骨髓性白血病由来の細胞株
U937	ヒトの組織球性リンパ腫由来の細胞株
ZR75-1	ヒトの上皮性乳癌由来の細胞株
HepG 2	ヒトの原発性肝芽細胞腫由来の細胞株
HeLa	ヒトの子宮頸癌由来の細胞株
A 431	ヒト外陰部の扁平上皮癌由来の細胞株
MRC-5	ヒト由来の正常線維芽細胞株
NIH/3T3	マウスの胎児由来の正常線維芽細胞株
Rat-1	ラットの胎児由来の正常線維芽細胞株

【0064】

7. 組み換えTxRII α タンパク質の精製と活性測定7-1) ヒスチジンータグ融合TxRII α タンパク質の調製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpcDNAHisにTxRII α の3'UTRを含む遺伝子全長（配列番号：1）をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることによりN末端側にヒスチジンータグが付加されたTxRII α タンパク質が細胞内で過剰発現される。常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、ヒスチジンータグ融合タンパク質精製用キットを用いて目的のタンパク質を精製した。

【0065】

7-2) フラッギータグ融合TxRII α タンパク質の精製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpcDNATagにTxRII α の3'UTRを含む遺伝子全長

をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることにより、セレノシステインがタンパク質に取り込まれ、TxRII α のC末端側にフラッギータグが付加されたタンパク質のみ、anti-Flag 抗体親和性カラムで回収することが可能になる。

【0066】

常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、細胞抽出液をanti-Flag 抗体親和性カラムに通し、Flagのペプチドを用いてフラッギータグ融合TxRII α タンパク質を回収した。

【0067】

7-3) MYC-タグ融合TxRII α タンパク質の精製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpCMVmycにTxRII α の3'UTRを含む遺伝子全長をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることにより、TxRII α のN末端側にMYC-タグが付加されたタンパク質が過剰発現される。常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、細胞抽出液にanti-MYC モノクローナル抗体を結合させたプロテインAセファロースを加え、4℃で2時間穏やかに搅拌した。遠心により、anti-MYC モノクローナル抗体を結合させたプロテインAセファロースに結合したMYC-タグ融合TxRII α タンパク質を沈殿させ、上清を取り除き、NETN buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 150mM NaCl) で数回洗浄した。

【0068】

7-4) 活性測定

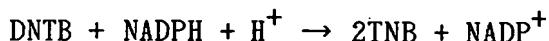
常法(Holmgren, A. and Bjornstedt, M. 1995, [21] Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Methods in Enzymol 252:199)にしたがって、DTNBアッセイ、およびインシュリンアッセイにより、TxRの活性を測定した。

【0069】

i) DNTBアッセイ

DNTBアッセイは、次の反応式に基づいて、DTNBからTxR活性によって生じるTNBを

412nmのチオールの吸収で測定する方法である。精製したタグ融合TxRII α タンパク質(1~50m1)をアッセイ用バッファー1に加え全量を1.0 m1とした。25°Cで5分間、412nmの吸光度を測定した(図3)。



アッセイ用バッファー1:

100 mM potassium phosphate pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.25 mM NADPH, 0.2mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1% ethanol, 1 mM DTNB

【0070】

その結果、3通りの方法で精製したTxRII α は、全てコントロールに用いた大腸菌由来のTxRと同等の活性を有することが判明した。ヒスチジンとMyc-タグ融合TxRII α タンパク質の活性が若干低いのはC末端側にセレノシステインが取り込まれていないTxRII α が混入しているため、反応を阻害しているものと考えられる。

【0071】

ii) インシュリンアッセイ

精製したタグ融合TxRII α タンパク質(1~50 μ l)をアッセイ用バッファー2に加え全量を1.0 m1とした。30°Cで5分間、NADPHの酸化を340nmによる吸光度の減少によって測定した(図4)。TxR活性によってTrxが還元され、還元型Trxが更にインシュリンの還元を進める。このときに、酸化されるNADPHの量からTxR活性を測定することができる。酸化されたNADPHの量は以下の計算式で算出した。

$$\Delta A340 \times 0.5 / 6.2$$

アッセイ用バッファー2:

50 mM リン酸緩衝液pH 7.0、20 mM EDTA、80 mMインシュリン、0.25mM NADPH, 1.6 mM大腸菌Trx-S2

【0072】

この結果、3通りの方法で精製したTxRII α は、全てコントロールに用いた大腸菌由来のTxRと同等の活性を有することが判明した。ヒスチジンとミック-タグ融合TxRII α タンパク質の活性が若干低いのはC末端側にセレノシステインが取り

込まれていないTxRII α が混入しているため、反応を阻害しているものと考えられる。

【0073】

7-5) 阻害剤アッセイ

組み換え体として得られた本発明によるTxRIIsの酵素活性と、天然のTxRの活性とを比較するために、阻害剤がどのような影響を及ぼすか観察した。TxR活性の阻害剤には、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)と13-シス-レチノイン酸を用いた。またTxR活性の確認には、DNTBアッセイを利用した。

【0074】

阻害剤の希釈系列を0.2 mLのHEバッファー(100 mM HEPES buffer pH 7.2, 5 mM EDTA)で調製し0.2 mL分注した。3 mMのタグ融合TxRII α タンパク質を調製して0.2mL加え、続いて3 mM NADPHと30 mM DTNBを含むHEバッファー0.2 mLを加えた。この溶液の反応系は100 mM HEPES buffer pH 7.2, 5 mM EDTA、1 mMのflag-タグ融合TxRII α タンパク質、1 mM NADPHと10 mM DTNBになる。25°Cで5 分間、還元されたインシュリンの量を412 nmのチオールの吸収で測定した。結果は図5に示す。

【0075】

この結果、精製されたフラッグ-タグ融合TxRII α タンパク質はこれまでにTxR Iの文献で報告されているように、CDNB と13-シス-レチノイン酸によって効果的にその活性が阻害されることが明らかになった。本発明によるTxRII α は、公知のTxRと同様の機作により酵素活性を発現しているものと推測された。

【0076】

【発明の効果】

高等動物のTxRについては1990年代に酵素としてはじめて精製され、アミノ酸配列が報告されたのは1995年になってからである。高等動物のTxRは、タンパク質の大きさや基質特異性において、それまでに報告されていた下等動物のホモログと相違していたため注目されていた。しかし、ヒトにおけるTxRIIsの存在については予測すらされておらず、本発明によって明らかにされたTxRIIsの構造と活性には大きな意義がある。以下に本発明の意義を具体的に述べる。

【0077】

本発明は、抗がん剤のスクリーニングにおいて重要な情報を与える。TxRが抗がん剤のターゲットとして注目されていることは既に述べた。そのターゲットに複数種の分子が存在したことを明らかにした点において、本発明の意義は大きい。すなわち、より確実な治療効果をもたらすためには、本発明によるTxRIIsを含めたTxR活性を総合的に制御するためのアプローチが求められる。このような取り組みは本発明の知見によってはじめて可能となる。

【0078】

本発明によって提供されるcDNAには、TxRIIsのC末端付近に存在するセレノシステインの翻訳に必要なステムループ構造を構成する3'UTRが存在する。この塩基配列がTxR活性の発現に必須とされているセレノシステインを含む領域の発現を支えている。本発明において明らかにした3'UTRはわずか130bpで構成され、このような短い配列によってセレノシステインの翻訳が可能になることは新規な知見である。

【0079】

更にXIAP結合性タンパク質を単離したという側面から本発明を見れば、本発明によるタンパク質はアポトーシスの抑制をつかさどっているXIAPに結合し、その機能を制御しうる可能性を持っている。このような可能性を通じて、本発明はアポトーシスの促進のための新たな技術を提供する。アポトーシスの促進は、がんやウイルス感染細胞のような異常細胞の死を誘導することによって疾患の治療につながる。

【0080】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Medical & Biological Laboratories Co.,Ltd.

<120> Thioredoxin reductase II

<130> M3-007

<140>

<141>

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1959

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1572)

<220>

<221> misc_structure

<222> (1567)..(1569)

<220>

<221> misc_structure

<222> (1664)..(1666)

<223> tga is transrated to selenosysteine, shown by Xaa.

<400> 1

atggcggca atg gcg gtg gcg ctg cgg gga tta gga ggg cgc ttc cgg tgg 51

Met Ala Val Ala Leu Arg Gly Leu Gly Gly Arg Phe Arg Trp

1 5 10

cgg acg cag gcc gtg gcg ggc ggg gtg cgg ggc gcg gcg gca 99

Arg Thr Gln Ala Val Ala Gly Gly Val Arg Gly Ala Ala Arg Gly Ala

15 20 25 30

gca gca ggt cag cgg gac tat gat ctc ctg gtg gtc ggc ggg gga tct 147

Ala Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly Gly Ser

35 40 45

ggt ggc ctg gct tgt gcc aag gag gcc gcc cag ctg gga agg aag gtg 195

Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly Arg Lys Val

50 55 60

gcc gtg gtg gac tac gtg gaa cct tct ccc caa ggc acc cgg tgg ggc 243

Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Trp Gly

65 70 75

ctc ggc ggc acc tgc gtc aac gtg ggc tgc atc ccc aag aag ctg atg 291

Leu Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met

80 85 90

cac cag gcg gca ctg ctg gga ggc ctg atc caa gat gcc ccc aac tat 339

His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala Pro Asn Tyr

95 100 105 110

ggc tgg gag gtg gcc cag ccc gtg ccg cat gac tgg agg aag atg gca 387

Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg Lys Met Ala

115 120 125

gaa gct gtt caa aat cac gtg aaa tcc ttg aac tgg ggc cac cgt gtc 435

Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly His Arg Val

130 135 140

cag ctt cag gac aga aaa gtc aag tac ttt aac atc aaa gcc agc ttt 483

Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys Ala Ser Phe

145 150 155

gtt gac gag cac acg gtt tgc ggc gtt gcc aaa ggt ggg aaa gag att 531

Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly Lys Glu Ile

160 165 170

ctg ctg tca gcc gat cac atc atc att gct act gga ggg cgg ccg aga 579

Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg

175 180 185 190

tac ccc acg cac atc gaa ggt gcc ttg gaa tat gga atc aca agt gat 627

Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile Thr Ser Asp

195 200 205

gac atc ttc tgg ctg aag gaa tcc cct gga aaa acg ttg gtg gtc ggg 675

Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly

210 215 220

gcc agc tat gtg gcc ctg gag tgt gct ggc ttc ctc acc ggg att ggg 723

Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr Gly Ile Gly

225 230 235

ctg gac acc acc atc atg atg cgc agc atc ccc ctc cgc ggc ttc gac 771

Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg Gly Phe Asp

240

245

250

cag caa atg tcc tcc atg gtc ata gag cac atg gca tct cat ggc acc 819

Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser His Gly Thr

255

260

265

270

cgg ttc ctg agg ggc tgt gcc ccc tgg cgg gtc agg agg ctc cct gat 867

Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg Leu Pro Asp

275

280

285

ggc cag ctg cag gtc acc tgg gag gac agc acc acc ggc aag gag gac 915

Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly Lys Glu Asp

290

295

300

acg ggc acc ttt gac acc gtc ctg tgg gcc ata ggt cga gtc cca gac 963

Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg Val Pro Asp

305

310

315

acc aga agt ctg aat ttg gag aag gct ggg gta gat act agc ccc gac 1011

Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr Ser Pro Asp

320

325

330

act cag aag atc ctg gtg gac tcc cgg gaa gcc acc tct gtg ccc cac 1059

Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser Val Pro His

335

340

345

350

atc tac gcc att ggt gac gtg gtg gag ggg cgg cct gag ctg aca ccc 1107
 Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu Leu Thr Pro
 355 360 365

aca gcg atc atg gcc ggg agg ctc ctg gtg cag cgg ctc ttc ggc ggg 1155
 Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu Phe Gly Gly
 370 375 380

tcc tca gat ctg atg gac tac gac aat gtt ccc acg acc gtc ttc acc 1203
 Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr
 385 390 395

cca ctg gag tat ggc tgt gtg ggg ctg tcc gag gag gag gca gtg gct 1251
 Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu Ala Val Ala
 400 405 410

cgc cac ggg cag gag cat gtt gag gtc tat cac gcc cat tat aaa cca 1299
 Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His Tyr Lys Pro
 415 420 425 430

ctg gag ttc acg gtg gct gga cga gat gca tcc cag tgt tat gta aag 1347
 Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys Tyr Val Lys
 435 440 445

atg gtg tgc ctg agg gag ccc cca cag ctg gtg ctg ggc ctg cat ttc 1395
 Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly Leu His Phe
 450 455 460

ctt ggc ccc aac gca ggc gaa gtt act caa gga ttt gct ctg ggg atc 1443

Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Leu Gly Ile

465

470

475

aag tgt ggg gct tcc tat gcg cag gtg atg cgg acc gtg ggt atc cat 1491

Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val Gly Ile His

480

485

490

ccc aca tgc tct gag gag gta gtc aag ctg cgc atc tcc aag cgc tca 1539

Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser Lys Arg Ser

495

500

505

510

ggc ctg gac ccc acg gtg aca ggc tgc tga ggg taagcgccat ccctgcaggc 1592

Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

515

520

cagggcacac ggtgcgccccg ccgccagctc ctcggaggcc agaccaggta tggctgcagg 1652

ccaggtttgg gggccctcaa ccctctcctg gagcgcctgt gagatggtca gcgtggagcg 1712

caagtgcgtgg acgggtggcc cgtgtgcccc acagggatgg ctcaggggac tgcgtggatgc 1772

acccctgcac cttttagcct ttgccgcccc gcacccccc caggctcctg gtgccggatg 1832

atgacgacct gggtgaaac ctaccctgtg ggcacccatg tccgagcccc ctggcatttc 1892

tgcaatgcaa ataaagaggg tacttttct gaagtgtgtaaa aaaaaaaaaaaaa 1952

aaaaaaaa

1959

<210> 2

<211> 521

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<223> Xaa(520) means selenosysteine.

<400> 2

Met Ala Val Ala Leu Arg Gly Leu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Arg Thr

1

5

10

15

Gln Ala Val Ala Gly Gly Val Arg Gly Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala

20

25

30

Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly

35

40

45

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly Arg Lys Val Ala Val

50

55

60

Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly

65

70

75

80

Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln

85

90

95

Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala Pro Asn Tyr Gly Trp

100

105

110

Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg Lys Met Ala Glu Ala

115

120

125

Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly His Arg Val Gln Leu

130

135

140

Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys Ala Ser Phe Val Asp

145

150

155

160

Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly Lys Glu Ile Leu Leu

165

170

175

Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg Tyr Pro

180

185

190

Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile Thr Ser Asp Asp Ile

195

200

205

Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser

210

215

220

Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr Gly Ile Gly Leu Asp

225

230

235

240

Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg Gly Phe Asp Gln Gln

245

250

255

Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser His Gly Thr Arg Phe

260

265

270

Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gln
 275 280 285

Leu Gin Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gly
 290 295 300

Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg Val Pro Asp Thr Arg
 305 310 315 320

Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr Ser Pro Asp Thr Gln
 325 330 335

Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser Val Pro His Ile Tyr
 340 345 350

Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu Leu Thr Pro Thr Ala
 355 360 365

Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu Phe Gly Gly Ser Ser
 370 375 380

Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu
 385 390 395 400

Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu Ala Val Ala Arg His
 405 410 415

Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His Tyr Lys Pro Leu Glu

420

425

430

Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys Tyr Val Lys Met Val

435

440

445

Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly Leu His Phe Leu Gly

450

455

460

Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Leu Gly Ile Lys Cys

465

470

475

480

Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val Gly Ile His Pro Thr

485

490

495

Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser Lys Arg Ser Gly Leu

500

505

510

Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

515

520

<210> 3

<211> 2056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (188)..(1669)

<223> tga(1664)..(1666) is transrated to selenosysteine, shown by Xaa.

<400> 3

gtcccgacc tcaggcccag ttcatgtac ttcccccttc tacttcctcc ctccagtc 60

ttctccatcc ctccctttt tggctgcccc ttgcctgcct tcctcgccag tagcttgca 120

agtagacacg atgacaccc ttgcaggcta aaaaggctga gagtggcact atgtgcagt 180

agccacc atg gag gac caa gca ggt cag cgg gac tat gat ctc ctg gtg 229

Met Glu Asp Gln Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val

1

5

10

gtc ggc ggg gga tct ggt ggc ctg gct tgt gcc aag gag gcc gcc cag 277

Val Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln

15

20

25

30

ctg gga agg aag gtg gcc gtg gtg gac tac gtg gaa cct tct ccc caa 325

Leu Gly Arg Lys Val Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln

35

40

45

ggc acc cgg tgg ggc ctc ggc ggc acc tgc gtc aac gtg ggc tgc atc 373

Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile

50

55

60

ccc aag aag ctg atg cac cag gcg gca ctg ctg gga ggc ctg atc caa 421

Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln

65

70

75

gat gcc ccc aac tat ggc tgg gag gtg gcc cag ccc gtg ccg cat gac	469		
Asp Ala Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp			
80	85	90	
tgg agg aag atg gca gaa gct gtt caa aat cac gtc aaa tcc ttg aac	517		
Trp Arg Lys Met Ala Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn			
95	100	105	110
tgg ggc cac cgt gtc cag ctt cag gac aga aaa gtc aag tac ttt aac	565		
Trp Gly His Arg Val Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn			
115	120	125	
atc aaa gcc agc ttt gtt gac gag cac acg gtt tgc ggc gtt gcc aaa	613		
Ile Lys Ala Ser Phe Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys			
130	135	140	
ggt ggg aaa gag att ctg ctg tca gcc gat cac atc atc att gct act	661		
Gly Gly Lys Glu Ile Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr			
145	150	155	
gga ggg cgg ccg aga tac ccc acg cac atc gaa ggt gcc ttg gaa tat	709		
Gly Gly Arg Pro Arg Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr			
160	165	170	
gga atc aca agt gat gac atc ttc tgg ctg aag gaa tcc cct gga aaa	757		
Gly Ile Thr Ser Asp Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys			
175	180	185	190
acg ttg gtg gtc ggg gcc agc tat gtg gcc ctg gag tgt gct ggc ttc	805		

Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe

195

200

205

ctc acc ggg att ggg ctg gac acc acc atc atg atg cgc agc atc ccc 853

Leu Thr Gly Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro

210

215

220

ctc cgc ggc ttc gac cag caa atg tcc tcc atg gtc ata gag cac atg 901

Leu Arg Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met

225

230

235

gca tct cat ggc acc cgg ttc ctg agg ggc tgt gcc ccc tcg cgg gtc 949

Ala Ser His Gly Thr Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val

240

245

250

agg agg ctc cct gat ggc cag ctg cag gtc acc tgg gag gac agc acc 997

Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr

255

260

265

270

acc ggc aag gag gac acg ggc acc ttt gac acc gtc ctg tgg gcc ata 1045

Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile

275

280

285

ggg cga gtc cca gac acc aga agt ctg aat ttg gag aag gct ggg gta 1093

Gly Arg Val Pro Asp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val

290

295

300

gat act agc ccc gac act cag aag atc ctg gtg gac tcc cgg gaa gcc 1141

Asp Thr Ser Pro Asp Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala

305	310	315	
acc tct gtg ccc cac atc tac gcc att ggt gac gtg gtg gag ggg cgg 1189 Thr Ser Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg			
320	325	330	
cct gag ctg aca ccc aca gcg atc atg gcc ggg agg ctc ctg gtg cag 1237 Pro Glu Leu Thr Pro Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln			
335	340	345	350
cgg ctc ttc ggc ggg tcc tca gat ctg atg gac tac gac aat gtt ccc 1285 Arg Leu Phe Gly Gly Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro			
355	360	365	
acg acc gtc ttc acc cca ctg gag tat ggc tgt gtg ggg ctg tcc gag 1333 Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu			
370	375	380	
gag gag gca gtg gct cgc cac ggg cag gag cat gtt gag gtc tat cac 1381 Glu Glu Ala Val Ala Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His			
385	390	395	
gcc cat tat aaa cca ctg gag ttc acg gtg gct gga cga gat gca tcc 1429 Ala His Tyr Lys Pro Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser			
400	405	410	
cag tgt tat gta aag atg gtg tgc ctg agg gag ccc cca cag ctg gtg 1477 Gln Cys Tyr Val Lys Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val			
415	420	425	430

ctg ggc ctg cat ttc ctt ggc ccc aac gca ggc gaa gtt act caa gga 1525
 Leu Gly Leu His Phe Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly

435 440 445

ttt gct ctg ggg atc aag tgt ggg gct tcc tat gcg cag gtg atg cgg 1573
 Phe Ala Leu Gly Ile Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg

450 455 460

acc gtg ggt atc cat ccc aca tgc tct gag gag gta gtc aag ctg cgc 1621
 Thr Val Gly Ile His Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg

465 470 475

atc tcc aag cgc tca ggc ctg gac ccc acg gtg aca ggc tgc tga ggg 1669
 Ile Ser Lys Arg Ser Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

480 485 490

taagcgccat cccitgcaggc cagggcacac ggtgcgcccg ccgcccagctc ctcggaggcc 1729

agacccagga tggctgcagg ccaggtttgg ggggcctcaa ccctctcctg gaggcctgt 1789

gagatggtca gcgtggagcg caagtgtgg acgggtggcc cgtgtcccc acagggatgg 1849

ctcaggggac tgtccacctc acccctgcac ctttcagcct ttgccgcccgg gcacccccc 1909

caggctcctg gtgccggatg atgacgacct gggtgaaac ctaccctgtg ggcacccatg 1969

tccgagcccc ctggcatttc tgcaatgcaa ataaagaggg tacttttct gaagtgtgt 2029

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa

2056

<210> 4

<211> 492

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Xaa(493) means selenosysteine.

<400> 4

Met	Glu	Asp	Gln	Ala	Gly	Gln	Arg	Asp	Tyr	Asp	Leu	Leu	Val	Val	Gly
1															

Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Cys	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Gln	Leu	Gly
20															

Arg	Lys	Val	Ala	Val	Val	Asp	Tyr	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Gly	Thr
35															

Arg	Trp	Gly	Leu	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Asn	Val	Gly	Cys	Ile	Pro	Lys
50															

Lys	Leu	Met	His	Gln	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Leu	Ile	Gln	Asp	Ala
65															

Pro	Asn	Tyr	Gly	Trp	Glu	Val	Ala	Gln	Pro	Val	Pro	His	Asp	Trp	Arg
85															

Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Val	Gln	Asn	His	Val	Lys	Ser	Leu	Asn	Trp	Gly

特平10-31042

100

105

110

His Arg Val Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys

115

120

125

Ala Ser Phe Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly

130

135

140

Lys Glu Ile Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly

145

150

155

160

Arg Pro Arg Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile

165

170

175

Thr Ser Asp Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu

180

185

190

Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr

195

200

205

Gly Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg

210

215

220

Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser

225

230

235

240

His Gly Thr Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg

245

250

255

Leu Pro Asp Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly

260 265 270

Lys Glu Asp Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg

275 280 285

Val Pro Asp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr

290 295 300

Ser Pro Asp Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser

305 310 315 320

Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu

325 330 335

Leu Thr Pro Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu

340 345 350

Phe Gly Gly Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr

355 360 365

Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu

370 375 380

Ala Val Ala Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His

385 390 395 400

Tyr Lys Pro Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys

405 410 415

Tyr Val Lys Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly

420

425

430

Leu His Phe Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala

435

440

445

Leu Gly Ile Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val

450

455

460

Gly Ile His Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser

465

470

475

480

Lys Arg Ser Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

485

490

<210> 5

<211> 130

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tcagccttg ccgccggca cccccccag gtcctggtg ccggatgtg acgacctggg 60

tggaaaccta ccctgtggc acccatgtcc gagccccctg gcatttctgc aatgcaaata 120

aagagggtac

130

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 6
gcgggatcca tgactttaa cagtttgaa gg

32

<210> 7
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 7
gcgctcgagc tactatagag tttagattaag ac

32

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 8

tatgatctcc tggtggtc

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 9

gtcatcactt gtgattcc

18

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 10

acagcttctg ccatcttcct c

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 11

agaaggttcc acgttagtcca c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 12

ccatacgttg ttccagatta c

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 13

acgatggcgg caatggcggt g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 14

accatggagg accaaggcagg t

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 15

ttaccctcag cagcctgtca c

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 16

gcgccatccc tgcaggccag g

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 17

cacacttcag aaaaagtacc c

21

<210> 18

<211> 103

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atggcggcaa tggcggtggc gctgcgggga ttaggagggc gcttcggtg gcggacgcag 60

gccgtggcgg gcggggtgtcg gggcgccgcg cggggcgcag cag

103

<210> 19

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gtcccgacc tcaggcccag ttcaagtgtac ttccccctctc tacttccctcc ctccagttccc 60

ttctccatcc ctcccttttt tggctcccc ttgcctgcct tcctcgccag tagcttgcag 120

agtagacacg atgacacacctt ttgcaggcta aaaaggctga gagtggcact atgtgcagtg 180

agccaccatg gaggaccaag

200

<210> 20

<211> 69

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

caggtcagcg ggactatgat ctcctggtgg tcggcggggg atctggtgcc ctggcttgtg 60

ccaaggagg

69

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ccgcccagct ggaaaggaag gtggtggtgg tggactacgt ggaaccttct ccccaag 57

<210> 22

<211> 145

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gcacccggtg gggcctcgcc ggcacctgcg tcaacgtggg ctgcattcccc aagaagctga 60

tgccaccaggc ggcactgctg ggaggccatga tccaaatgc ccccaactat ggctgggagg 120

tggcccagcc cgtgccgcat gactg

145

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

gaggaagatg gcagaagctg ttcaaaatca cgtaaaatcc ttgaactggg gccaccgtgt 60

ccagcttcag gacag

75

<210> 24

<211> 79

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aaaagtcaag tacttaaca tcaaagccag ctttgttac gagcacacgg tttgcggcgt 60

tgc当地ggatgg

79

<210> 25

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

特平 1 0 - 3 1 0 4 2 2

attctgcgtt cagccgatca catcatcatt gctactggag ggcggccgag ataccccacg 60

cac

63

<210> 26

<211> 71

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atcgaaggtg ccttggaaata tggaatcaca agtcatgaca tcttcggct gaaggaatcc 60

ccttggaaaaa c

71

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gttgtggtc ggggccagct

20

<210> 28

<211> 92

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

atgtggccct ggagtgtgct ggcttcctca ccgggatigg gctggacacc accatcatga 60

tgcgcagcat cccccctccgc ggcttcgacc ag

92

<210> 29

<211> 175

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

caaatgtcct ccatggtcat agagcacatg gcatctcatg gcacccgggtt cctgagggc 60

tgtgccccct cgccggtcag gaggctccct gatgccagc tgcaggtcac ctgggaggac 120

agcaccacccg gcaaggagga cacggcacc ttgacacccg tcctgtggc catag 175

<210> 30

<211> 137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gtcgagtcggc agacaccaga agtctgaatt tggagaaggc tgggttagat actagccccg 60

acactcagaa gatcctggtg gactccggg aagccaccc tcgtgccccac atctacgcca 120

tttgtgacgt ggtggag

137

<210> 31

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

ggcgccctg agctgacacc cacagcgatc atggccggga ggctccgtt gcagcggctc 60**ttcggcgggt cctcagatct gatggactac gacaat**

96

<210> 32

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

gttccccacga ccgtcttcac cccactggag tatggctgtt tggggctgtc cgaggaggag 60**gcagtggctc gccacggca ggagcatgtt gag**

93

<210> 33

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gtctatcacg cccattataa accactggag ttcacggtgg ctggacgaga tgcaccccag 60

tgttatgtaa ag

72

<210> 34

<211> 98

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

atggtgtgcc tgagggagcc cccacagctg gtgctggcc tgcattcct tggccccaac 60

gcaggcgaag ttactcaagg atttgctctg gggatcaa

98

<210> 35

<211> 195

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

gtgtgggct tcctatgcgc aggtgatgcg gaccgtgggt atccatccca catgctctga 60

ggaggttagtc aagctgcgca tctccaagcg ctcaaggctcg gacccacgg tgacaggctg 120

ctgagggtaa gcgccatccc tgcaggccag ggcacacggt gcgcggccg ccagctcctc 180

ggaggccaga cccag 195

<210> 36

<211> 290

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gatggctgca ggccaggttt ggggggcctc aaccctctcc tggagcgccct gtgagatgg 60

cagcgtggag cgcaagtgct ggacgggtgg cccgtgtgcc ccacagggat ggctcagggg 120

actgtccacc tcacccctgc acctttcagc cttgccgcc gggcaccccc cccaggctcc 180

tggtgccgga tgaatgacgac ctgggtggaa acctaccctg tgggcaccca tgtccgagcc 240

ccctggcatt tctgcaatgc aaataaagag ggtactttt ctgaagtgtg 290

<210> 37

<211> 66566

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

atggcggcaa tggcggtggc gctgcgggaa ttaggagggc gcttcgggtg gcggacgcag 60

gcccgtggcgg gcgggggtgcg gggcgccggc cggggcgcag caggtaggat ggggtcgggg 120
 cgtccccgcg gttaggtgtcc gcgcggccgg ggtgtcctcg tgagggtgtc cgcgccggcgg 180
 tggccagggt gtccccgtgg gggtgccac gcgggggtgt ccacataccg gcctcttgg 240
 ctatgtttgc tcaggagtcc gggctgcttc tagccacaag tagccccctt cccaggtggg 300
 gaaactgggg ctgggtgcct tgtctaaggt cctgctgtgc tgactgcacc tgtggctcc 360
 cagagctggt atcccaagtaa caactacagt tctgaagatg atgatatccc acctccgag 420
 gtcaccaggc accggcccca ctggccagac ttcccaactt ctccccagac ccctagactc 480
 tagaggttag aggctgcaca gagcaatggg aggatacaca ctcgtccctcc tggagccct 540
 gaagaacagt taactaaatc aggacaataa tcataactga gcactcgaag cagaggctgg 600
 gtgtctggtc actcaggaca gttcaagcct catcctgttag gacagactcc cctagatccg 660
 accagagcgc caccatatct gttatgtgtg gccagttca ttccatgcac gacaacatgg 720
 tcccccacca tgcagggggc ccctcgaccc agccccctgg atgcttgcga cagcgagcag 780
 ctctccccac aggcagttag ttagaggggg ttagaggacg gggtcaggc tccttccag 840
 ggatggcggc tatgggaggc atggtggtc gcccctcgcc cgcggtggac tcgggaggga 900

gggctgactg tgtgtgtcaa tggcagagt tggtgctatg gaggttttg gggctccag 960
 gacggagggt gccccaacag agttctggaa ggcagtcacc acctcgtagc cttcgatgaga 1020
 cctggAACCC tcagccaggg cactccatct ttcaaagctt cttggctgca tgcgtcaggt 1080
 gggcaagctc aggaaggta aatgcaccccg tgctggcgga gtcccataaa aggggattcg 1140
 gcatcaaaag gaggaaaaag gttcaaaagg catttatcat ggggttcaga atcacggatg 1200
 tgagggcgg tagtggggac aacagacaga aaagcttccc cttccatac tcacagtcca 1260
 gacacggcaa tagccaaatt ccaaatttct aggtattctg gactcagaat gggaaatatc 1320
 atacgagact taggggata atgcccttat cttcctattt taaggaaag aacaaactga 1380
 accttctatg caaaatagga tggatgtcct ggtccccc gtaagaaata aaataagtag 1440
 tctccaggca ttcccttccg ccagaggagc aactgtttt taaatagccc tttcggtccc 1500
 agtctgttac taaaccatat gagttttttt ttggggttt tttttttt tttttttt 1560
 agacagtgtc ttttgtgtc gcccaagctg gactacatgt gtgcgtatctc agtcactgc 1620
 aagctccgccc tcccggttc acgccattct cctgcctcag cctcccgagt agctgggact 1680
 acaggcatct gccaccacgc ctggctaatt tttttgtat ttttagtaga gacgggattt 1740
 cactgttatta gccaggatgg tctcaatctc ctgacacctat gatccacctg cttggccctc 1800

ccaaagtgct gggattacag gcatgagcca ctgcgccag ccgagtcatt tttaatact 1860
 actgcatgtg agttaacaca atcattccca aattgaagtt ttagatggc cctcaaaatt 1920
 ttaggatat ggtttccta caggttata ttgaaagtat gggtatctc ctattactcc 1980
 tcttttatt tgcttaaag gagaaaggga gaggccagag accaaatgtc cccatttccc 2040
 tatagcta at ctcttgaa gacaaggcagc ccagacttga gcttctagat ggatacaacc 2100
 aggtgcattt ccaaggcaca gaggaggta ttataaccc atagtaacat taaatgcagt 2160
 gccttctcct ggctgagcgg tgcaacggtc atctgttagtt ccaggcatcc acacactatc 2220
 gttagtagat atttctgcag gagcatccat ccaggtgaga ggtcgataa gtggaggaaa 2280
 aggcacataa gcccaataag aataattttg ttagcaggt aaatcagttt aaggggaaac 2340
 tggtgagaca gaaagtgtaa ggaagataat tattaaataa aacctattgt aagtgagatc 2400
 cagtgcgtaa ggaggaagag aagaacagag ggatgttatt ttcaggctaa tagaaatgg 2460
 gagatttta ggtcgtaag gagaaaaaga taattaggag aagtggatt agtttagaggg 2520
 ttttacattt ccattaggaa ggattgaacc agacccattt tgattggca tgccagttc 2580
 tgaggagtcg gtacagatct catcaggtat gagggcagtc tctgacgcga acgtctttc 2640

ctcgtggttt ttattgtcag tattcacacg aagttaagt ctcttagtgg gcacccagac 2700
 gggattgacg atctcctggc aaaacacaag cataccctct tccccacgtt ataattgttc 2760
 caggccc ggtattggtt tgggagtttt tccatgacac tggcttgcc tcgttttaggg 2820
 agaattttt gcctgtataa tggcatttag ctgcagtcag agtattgttt ttaggaacat 2880
 ttagaaagct taaacaatgc taaatataat tgggagtgccc gagtagttaa attatgcttt 2940
 taaaccagcc ttgtcttc ttacagtaac ttgaagaggt ttagtaattt ttacacgtt 3000
 tggaccgaga ccgagtctgg aaacaaaccc catgtttcc attatagtt gactgggagc 3060
 actgtaaaag ttatgtggaa tattaatttc agccccatt tgtgccagca aatctctgcc 3120
 ccgaagatta atggggatgg gcatgatata aggctgaatt gttcccttt gaccatcagg 3180
 gccagtgcaa gccaaagataa atgtgctcg gtgaacttct tcagctttc taacaccttc 3240
 tagttcatg ttagtggat gtttaagcca ggaggaaggc cataaattag aggaaataat 3300
 agaaacatca gccccagtat caactaggcc ctcaaccttt ttcccttcaa tgtgtatgg 3360
 gcaggttaggc cattgtttag aaattacatt aatccaataa gcggctttt caccgctgg 3420
 gccccatccca gggccccatg tcttatctcc ttgtttaaa acaatgttag gtagaaaaag 3480
 taattgagca attgactcac tggccggaat gaaaacagga actttggcag acaccataag 3540

ttacataag ttaatctca tcagaggaat cagaattaat gagactagta tgaactatga 3600
 taccttagt atcatgaggt ggtgcctg cctaacacca ggcccaccga accttgagg 3660
 aaaggccag tgaccccat gggacaatt aaaggcaaag aattaggtag taaatttaga 3720
 ggaatggcac tacagagatc gaccgcctg ctgcctactg tggaggtaga caagcattgt 3780
 actgagacag aagaagaggc tggacccat ctggattggc tgttagtaaa ttttttgt 3840
 ctggggctg cggtggact gcttgacgca aaaacacaac attggctgtga gtccgagg 3900
 tcccatttga tattgggccc tggactggc ctgttcctt gttccctgg ttctgtggca 3960
 agggatttc atctatatca gactgagtgg caagtacttg cccaatgttt acccttacga 4020
 caacgcaggc aaacagtagc aggagcattt gcccgtgtt gttagccgg cttggccgct 4080
 tttaagttt taacagtgtt gttttttgg gtatgaccaa gttggccaca attatagcag 4140
 gctccaagaa aagaatcagt cgagccagtt tggttgccgt gttcatggc cggtgcccac 4200
 agaatagctc tgggtctc cgatccaacg ccattcacaag cttaatata tgcaggcaac 4260
 acctcatgat caggtaaatt ttgacgtagg atgaaatgca cggccatttt acactcatgg 4320
 ttgcattt gaaaagctaa catatgaaga agaatacctt gagtgctc atcagagaca 4380

gattttcaa cagcatctt taatttagct aaaaaatcaa gatataattc attgtgaccc 4440
 tgTTTaaaca tagtaaaaga aacagaagct tggctgggg tgcgtiaattt atcccaagct 4500
 cicatacaca ccttgcgtac ttgtccgtg gtgagagcat caaagcctaa atgagcagta 4560
 gtatcagagt aattatcgga gcctgtgagc tgaggctgag taattggaat gccatcagcc 4620
 cgatTTAGCT gagcctgcag gcgggcctcc tctgaccacc aggtatggaa ttgtaaaatgc 4680
 tgagaatggag ttagaacagc ttttgccaaa aggtcgcagt ctataggaag caaaatgacc 4740
 tcggtacaaa gagtctgtaa tacgttttaa catatggaga agtaggaaca tactgagttac 4800
 aagcatcctt gaattctttt aaaaaggtaa gattgagcgg cgtatatcga cacacttgta 4860
 ccccttgagc attaggaggt tccagcatga ccgaataagc ccacgcctct aatctacttg 4920
 ttgtttgg cgtaataagc attgcattgaa agtttcaaga gcagggcacat gagatagagt 4980
 cggcatagaa gtgacaggaa aagtatgtat agataagaga aactgagatt gacgggtcg 5040
 gactggtata agagtgtgag aaagggcat tgggggagca gaagaggcag aagcataactg 5100
 gtgattactg gcccagtcct gcacaaccag agtggcaggg gtgtccctgc atgaagaagg 5160
 gtacagagaa gcaggttgag tggatggcaa agtgaccggt tgaggacca aaatgatagg 5220
 agggtgaggg gctgtggtgg atgggggagg gcctgcagaa ttacaggtaa attgttagtt 5280

ggatggctcc ggaggcaaag actgtaaagg tttggagagg gaagagtagt catagatatg 5340

gtcctggct gtctgagttg gggccgcagg agctacaagt gtcggcttt cgtaaaaga 5400

aataagatca tcaggggttg atgttaagcc aaagtcaactg gagttagata ttgaatcctc 5460

agtatcgta ggtggggag gagtaggcaa agggaggggc tgagcagata atgaaggccg 5520

agtggagag gaaagctgag gaagaggtag agggtggcca gattcagaaa actgtggtaa 5580

ctgcagggtg tcacggatt ggtatgtcat taggatggca cgtaccaagg cccaatcacc 5640

ccaaacagtg acaggaacat aatttcctgt tgggaccagt tctcggatt ttgcaccaac 5700

atgatccat agttccacat ctaacgttcc ctttcagga aaccaaggac agtgttctc 5760

cactgccctg aatagggtga ccatattttc catggaaacc cgaactcccc catttaaca 5820

ggaatttaat atagcagaga taagcataat gtttagactc tgcgtgaccc atagttaccc 5880

cggagaatac acagacaact caccaatcgt tggggagcca aacaagcatt tctgtggact 5940

ggaccgatga acatttctcc gcacctacca aagggaatcg ggttcccaca tgcacttagg 6000

aaaaagaaaa ccacgttggg cgccagatat tggggaaacc tgccccataat atttcaacgt 6060

acgttcttcc tattttctgt aagtgtcagc cggctgagaa atgaagagaa agagtacaaa 6120

gaggaattt acagctgggc tgctggggt gacatcacgt atcggtagga ccatgatgcc 6180
cacctgagcc gcaaaaccag caagtttta ttaaggattt taaaaggaga ggggttgtgc 6240
caatagggag taggtcacaa agatcacatg ctcaaaggaa caaaaggcag agcaaagatc 6300
acatgcttct gaggaaacag gacaaggca aaatcagaac tcctgataag ggtctatgtt 6360
cagctgtgca catattgtct tgataaacat cttaaacaac ggaaaacatg gttaagagc 6420
agagaaccag tctgaccaca aatttaccag gacggagttt ttccccacc ctaataagcc 6480
tgagggtact gcaggagacc agggcgtatt tcagtcctt tctcaaccgc ataagacaga 6540
cactcccaga gtggccgtt acagacctcc ccccaggaat gcattccctt tccagggct 6600
taatagtaat attccttgct aggaaaagaa tttagcgata tctctcctac ttgcacgtcc 6660
atttataagc tctctgcaag aagaaaaata tggcttttt tgcctgaccc cacaggcagt 6720
cagaccttat ggttgtttc gttccctaaa aatcactgtt attctgttct tttcaaggt 6780
gcgcgtgattt catattgttc aaacacacgt ttacaatca atttctacag ttaacacaat 6840
tatcacagtg gtcctgaggt gatgtatatt atcagcttat gaagataaca ggattaagag 6900
ataaagacag gcataagaaa ttataaaagt attacttggg ggcccaggcg cggtggctca 6960
tgcctgtaat cctagcactt tgagaggccg aggcagccat atcacaaggt gaggagatca 7020

agaccatcct ggctaacatg gtgaaaccct gtcttcctg aaagtacaaa aaattagcca 7080
 ggtgtggtgg cgggtgcctg tagtcccagc tactcaggag gctgagacag gagaatggtg 7140
 tgaacccagg aggcggagct tgcagtgagc tgagatttg ccactgcacc ccagcctggg 7200
 cgacagagag agaatctgcc tcaaaaaaaaaaaaaaaaagaaaaaa aaagtataaa agtattactt 7260
 gggaaattgat aaatgttcat attgaaatga aatcttcaact atttatgttc ctctgccacg 7320
 gctccagcca gtccctccat tcggggttcc tgacttcctg caacacaggt gtgagccact 7380
 gtacccagac taggggtgca gtttttttttttttttttctgagacaga gtctcactct 7440
 gttaaccagg ctggagtgca gtggtgctat catagctcac tgcagccttg aactcctggg 7500
 ttcaactcac cctccagcct cagcctccct agtagctggg actgtgggcc ctgcagttc 7560
 tccttttaga gtaggaagac ctgaactgtc ccaggcttgg agtgggtggg cgatgcagcc 7620
 cctgaacagg agccagaatg acaacacctg ctgcccaggaa agagctctag atagagcagc 7680
 catacaggag ggccccctgag gtggcaccct gaggtggcca gcctgcctgt gggtgacat 7740
 tttgggggac cttccactt gccctcactg gtgcagtgct gcattctt gggccttgc 7800
 atgagctctg ggctcctgct ctttgctggc ctgtaccagg cagtggttc aaagaggagc 7860

agaaaattaa tggacaatat gtcagaaggc agaggcaaga cagacacttg ctggggccaa 7920
 gcccgcagg tggagagggt atgcctggct aaagtgggtg aaaggcaagg ttatgaggtt 7980
 ctccaggaca ctggagtgc caggtggtgt gtccccaggt aacgcctgcc acccagccct 8040
 tcctcccaca gaacagcatc tgccctaccc acctttgagg tacttgggg tccttccttc 8100
 ccagcaggct acccaagccc ttccaagtgc ttaaaggcag atttcctatg cttgcaaacg 8160
 actgccttat gccagtgttt atcagcccgaa gagggctccct gggtgtgcac agggggcgag 8220
 caagctgccc aagataagca catccataca gacagctgct caccctgcct gatagcagac 8280
 agagggggca cagtgcgagg ctgcaggca ggatgaccta acaagggccc tgctatggca 8340
 acaagaagga caggcacctg ccatggaagg tagggacgtt ctgagcaaag cttccggcta 8400
 ccaggcagct ggaggagaga gatgcttctc catcagcagg ttcatgctcc ccgggggacc 8460
 tggtggcatt ttctccctga ccagcagtcc ttggttctct agacttataat taaagccatt 8520
 agaataattt acaacaattt aggccttcc agagcccttg agttgaatta ggaatttgagt 8580
 gtgctttgga ctggctgttg gaaccgagtt gtggctctgt cagttccgc aggtgcgcac 8640
 acatctcacg tgcaactcaga ggctggctgc caggtgaaag agtgggtggg tttggttgtg 8700
 gggcaggctc gctgcaggcc atggcctgag tgccctggatg cagttccca agcttctca 8760

gctgtgagcc agggctcctc taggctccag ctcttgtatc ctttaggagt gcatgttcta 8820
 gacctgtctg tggggcatct gcagggccag ggtgtggaga gacatgacac tccaagtaca 8880
 ctctctgcag ccttcctgc ctaggaaggt ggagggtggct gcaaagataa gtgcagcctt 8940
 ctcatggcag acgctaggct ctgatggagg ttttggcag gttgccagc cttgtatgac 9000
 agaccctgct ctgatcatgg aacctcttgg ctttgtctga agcagcgacc ggctccagat 9060
 gctctggag ggtggtgctt ctcatctggg caggctcgtg tctgcagagg ggctgagggc 9120
 actacttgtt ttatacccta gagtcttgc atcagtccttcc accctgcctt cacccagca 9180
 gactgatgac ttgttattat ttcttccttc cttcagcagg gagttggctg gtgcctggtg 9240
 ctgggtgtcc cggacctcag gcccagttaa gtgtacttcc cctctctact tcctccctcc 9300
 agtcccttct ccatccctcc ctttttggc tgcccccttgc ctgccttctt cggccagtagc 9360
 ttgcagagta gacacgtatc caccctttgc aggctaaaaa ggctgagagt ggcactatgt 9420
 gcagtgagcc accatggagg accaagggtga ggcgacacca caaccagcccc aaaaggaatt 9480
 ccagggatga aacctgagcc caggcagctc tccctgtgcc caggggtggct tccctccctag 9540
 ctgactgcag ctgggcacac caagaccctg gctgtgtgca ctggccagct gtgagggaca 9600

ggggctgctt gtgctttat tctttttt tttttttt ttgagacgga gtctcactct 9660
gtctccagg ctggagtgcg gtggcggtt atccgctcac tgcaagctcc gcctcccggg 9720
ttcacgccat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg actacaggcg cccaccacca 9780
tgcccgcta attttttgt atttttagta gagacgggtt ttcactgtgt tagccaggat 9840
ggtctcgatc tcctaacctt gtgatccacc cgccctggcc tccaaaatgt ctggattac 9900
aggcgtgagc taccgccccct agcctgtgct ttatcttg ctcacttgt acggagggca 9960
gccttcacaa ctgaaaggca cgtggacttg agaatgtttt agtccacctt ggtggctcat 10020
gcttgtaatt ctagcacctt gggaggccaa ggiggaagga ttgcttgagg ccaggtgtt 10080
gagaccagcc tggcaacat agccagaccc catctctaca aaacaaaaaa atttagctgg 10140
acgtggtgat cggtgcttgt agtcccagct attctggagg ctgaggctag aggatcactt 10200
gagcccaaga ggttagaggct gcagtgagct gtgattgtgc cactgtgccctt ctgtcggtt 10260
ggcccttccg ggtctatgtc ccagccctgt gctgaccgtt ttccttctca cctttcatcc 10320
ctcccccaag cagggcagtg gactacaatc ttctgggtga cagagtgaga tcctgtctca 10380
aaaataaata gaataaaaaaa gaaaatatct tagttctgtg tctggctgag aacactgggt 10440
gaggtttgag tttagtgg ttggatgggt gtgcgtgtga ttttgcggaaatgatcacac 10500

acgcccacgg ccaacctcac caccatatgg ctgggtctct ggattgcac agactatgtg 10560
tatcgagtca ctctttctgc tctgttgtt ggtgtcttgt cacccctgac catcacagaa 10620
tggagtgcc aatccgtata aaattgatcc tgtaccacgt ttaaccagac agacagtccg 10680
tcccacctct catcccttct ctcagcaggt cagcgggact atgatctcct ggtggtcggc 10740
gggggatctg gtggcctggc ttgtgccaag gagggtatgt attctgtata cttcgtggca 10800
aggcctcgaa gcttttaggg cccctagaga gggtggtgct gtccagaaaa cgtccatgag 10860
caaaatgcgt tgccctccctg ctggggtcac cccagtgcc tctgttgtt ggcttgttcc 10920
ctgccactct ccagctgtct gctgtaccca gcggccgccc tggcacttca tggctgaact 10980
gccttcctca gctccagccc tccagctctt ctgccttact cacagtgaca gccccaaatcc 11040
gactagtctc agctcccacc actcacaccc tccgtgggct ccccaacttc cttcacgtgc 11100
ttctggacag tccttcctt caccttactg tggctgtcac cctgcctgccc tgctctctgc 11160
ccctgcccgg cttagctgcga ggctggagct gcaccctcct gcttgcctt gtccttggtc 11220
tttagtgctgg tgcctttcccc cagggtccat ggtcagttct gctgggtgag tcttgtactt 11280
ggcctggcac ccattgagta aagatgttgg gctaacaacggc tggacccaga ggtgtccaga 11340

gatgacactt tgca~~tt~~c~~t~~c c~~t~~ctaa~~cc~~ca cgtga~~tgcac~~ aggccaccag cacttgc~~ca~~ 11400

gactctgtgc cctgctgttag gagttc~~c~~tgg tctgctctgg ccatgtctac acaatgataa 11460

gagggcagtt g~~ig~~gtgaatg gggagggaa~~g~~ gggatgagag ggagg~~t~~gggg ctgaaatgag 11520

agggagttaa ctgggcactt tggcc~~c~~t~~g~~aa gctgtgc~~t~~c tctgatgtcc agtattggc 11580

tctagaagca tacatggtgt aaaagaaatc cactacttt gctctgtggg ggccggggag 11640

tgtgttagaa cctgggaagt ctcc~~t~~ggc~~c~~t attggggatc cg~~c~~agaggca cccaggatca 11700

gtgccacact gtactctcag aaccactccc agaaacgatg gcgcaggcag ccacgaggcc 11760

tagtgctgtt ccttttagca gaccggcac ctgggctgtg cg~~t~~cactcc catgctggg~~a~~ 11820

gtgaccagct gcagagac~~c~~t g~~a~~gtcccc~~t~~taatccggaa tgtggacagc tcctgggtat 11880

gtctccgc~~c~~t ttcatgagag tggcattcc ctgcagagga tgacgtgg~~t~~tttgtggc~~t~~tt 11940

tttgagatga actgtaccta tcaaaatggg caac~~c~~t~~g~~atc attcttatgt gtgc~~a~~tgtgt 12000

ccatgcagcc agtaccgcag tcaagatgg cgagtgtgc ctccaccccg ttagtctgc~~c~~ 12060

agggctg~~c~~cg taataaacag actgccataa cagactgggc ggctgaaaca acacatgctt 12120

attgtctctc agttctggag gctagaaatc atccagg~~t~~gc gggcagg~~g~~ct gatttcttct 12180

gaggcctctc cgttggc~~t~~g tagatggcag ttgtcgtccc tctgtgc~~a~~t~~g~~ tctatgtc~~c~~t 12240

aatcttacc tgtacctgc ctaatggatc aggtggatgc cctcttattt ttttggctt 12300
ttattggaga cagggtcttg ttctgccctcc caggctggag tgcagtggcg tgcactcagc 12360
tcactgcaac ctcaaactcc tgggttcaag ccattcctcct gccttagcct cccaaaatgc 12420
tattacaagt gtggccactg tacctgtata tggcctaatt tttttttt ttttttgag 12480
atggagtctc gctctgttgc ccaggctgga gtgcagtgggt gtgcactcag ctcaactgaa 12540
cctctgcctc ccgggttcac gccattctcc tgcactcagcc tcccagtag ctgggactac 12600
aggcgccccac caccacgccc ggctaatttt ttttattttt agtagagacg gggtttact 12660
gtgttaacca ggatggtctc aatctcctga cctcatgatc cacccacctc ggcctcccaa 12720
agtgcgtggaa ttacaggcgt gagccaccgc gcccggccta tggcctcatt ttaacttaac 12780
tacctttttt tttttttgc aagcgagtct tgcttgcata cccaggctgg agtgcagtgg 12840
tgagatcttgc gctcaactgca acctgtgcct tctgggttca agcgattctc ctgccacagc 12900
ctccctgagta gctaggatta caggcgctg ccaccacacc tggctaattt ttgtatTTA 12960
gttagagacgg ggtttacca ttttgtcaa gctggtctcg aacttctggc ctcaagggat 13020
ccgcctgcct cggcctccca aagtctggg attacaggca tgagtacccg tgtccagcca 13080

acttaattac cttttgaag accctatctc taaatacagt cacattctga agtgcttaggg 13140
 tttagggctt ccacataggg attttaggg gatatggctc agcccataac accccaacat 13200
 ttctgaaac ctggcagtt cttccggct tccccactt ctgcattcta ggcaaccagg 13260
 catgtgctgt ctgtcaactat agtttgattt ttctataatt gcgtataaac ggaatgctgc 13320
 tgtatgtcat cttcccttc tggcttctt cactcagggt aatgaccttg agactcatct 13380
 tcgttggcgc gagtgtcgat ggtttcttc tttcattgc tgagtatgt tctgtttatg 13440
 gctgtgccgt ttcgtgtacg tggcccttg tagctggaca cttgaattgt ttccacctt 13500
 tggccattgt ggacagtatt gctgtgaacg tctgtctgtg tgtttggtg gatatatgtt 13560
 ttaaattatt ttggtaagt gcctaaaaat ggaccaactg gatcgtgtgg tatatcttt 13620
 atttaggtat ttttcattt cttttagcag cattttgttag ttctttttt actcaagttt 13680
 tttttttta ttaaaaaaaaaa gaaagatgag ggtctctctg tggtggccag gctggctca 13740
 aaatcctggg ctcaaatgat cctcccacct tggccctcca aaacgttggg attacaggaa 13800
 tgagccacgg tgcctggcct gtggtttca atgtctacgt ctttcacata ttttatcaga 13860
 tacatcccta agtgtttcat attttagaa tagtttattt gagatataacc tcacattacg 13920
 tatgcatttg tcccttgta cccgaggacg actgggttca ggaactcccg ctgttagcag 13980

aatccatgga cactgaaatt tgtgcatact ggagtcaaggc agttggccct gaagcaccca 14040
cagatacaga gtcagccctc tgtatatata gtttgcatc ctatgaatac tgttttttc 14100
ttttcttgc ttttcttct ttctttctt tctttttttt tttttttttt ttgagacaag 14160
gtctcatgtg ttgcccaggc tgcaaaaaat ggtgcaatct cggctcaactg caacctccac 14220
ctcccggtt caagcgattt tccccacctca gcctcccgag tggctgggac cacaggcgcc 14280
accatgccca gctactttt gtatTTTTT ggtggagaag gtgggtttcg ctatgttgcc 14340
caggctggtg ttgaatttcct gagctcaagt gatccgtctg cctcagccctc ccaaagtgt 14400
ggattacagg catgagccac catgtccagt ggagtaactgt atttccaatc cgagtttgt 14460
tacagatttgaacttgctg atatggagag ataataatata tatttttttgaagccgagtt 14520
tcgctcttgt cacccaggct ggagtgcattt ggcacaatct cagctcaactg cactctccac 14580
ctcctggatt caagcagttc tcttgccctca gcctcccgag tagctgggat tacaggtgcc 14640
tgccaccacg cccagctaat tttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttgcc 14700
caggctggtc tcgaactcct gacctcaggt gatccggcca ctttggccctt ccaaagtgtt 14760
gggattacag gggggagcca ctgtccccgg tcaagggatt atatttatttgg aaaaaaaaaatc 14820

catgtatgag tggacctgtg cagtcaaac ctgttttatt caagaacatt ttagtttctc 14880
ccccaaaatac cctgtaccca ttggcagtc gtcicttccc ccctctccccc agcccccggc 14940
aaccactaat ctacttccta tatccgtgga tgtgtctgtt ctggacattt cagctgtttt 15000
ttggttggtt ggttgttgtt ttcagacag ggtctgactc tggcccccag gctggggtgc 15060
agtggcacca tctcggtca ctgcaacctc ggcctctcgg gctcaagcaa ttctccacc 15120
tcagccccc gagtagctgg gattacaggt gtgcaccacc acatccagct aatttttgt 15180
attttagta gagacgggt ttcaccatac tggccaggct ggtcttgaac tcttgacctc 15240
tcaagtgttc cacccacctt ggcctccaa agggttggga ttaacaggtg tgagccggc 15300
ttgttttgtt ttttagatg gagtctcgct ctgtcacccct gactggagtg cagtggtgt 15360
atcttggctc actgcaacct gtgcctccctg ggctcaaattt attctccctgc ctcagccctcc 15420
caagtagctg ggaccacagg cacacaccac tataccgac taatttttgt acittttagta 15480
gagatgggtt ttcaccatgt tggccaggct ggtcttgaac tcttgacctc aggtgatccg 15540
cccacctcgg cctcccaagag tgccggattt acaggcatga gccaccgtgc ctggcccttt 15600
cgcatattct tttctttttt ctttctttttt tttttttttt gagacggagt ttgcgttttg 15660
ttgcccaggc tggagtagcca tggcacaatc ttggctcacc gcaacctctg cctcccaaggt 15720

tcaagcaatt ctcctgcctc agccctccta gaatggta ttacaggcat gcaccaccac 15780
 gcctggctaa ttttgttattt ttagtagaga aagggtttct ccatgttgag gctggtctt 15840
 aactcctgac ctcaggtgat ccacccgcct cggcctccca aagtgtggg attacaggcg 15900
 tgagccacca tgcccgcccc tgcactttct tggatgttatac ctttggccca caaaagttt 15960
 aaattttgtt gaagtcctaa tttatctatt ttttccctt gtgtgttatg attttgttat 16020
 catagctaag aaatccaaga tcacaaagat ttacacctgt gttttttct aagcattta 16080
 tagttcaagc tcttacagtt aggtctttga ttatatttga gtgtgttatg gttttatggc 16140
 atgtacctta acttgccagt ctacccttaa aaaagcatac atctattcca cccctccctaa 16200
 ctttcattct atgttattat atcatgtgtt tactgttaca tggtataaat ccatgataca 16260
 tcattattat ttttgtttaa aatatactta aatcggtgtga gaaaatctca catactcacc 16320
 cattgtatTT ctgtgtctt cattcccttg tgaggatcca cattccatc tggtatTTT 16380
 cttctacctt aagggcatcc tttagcattt ctgttaatat ggctctgggg gtaatgaatt 16440
 ctctcagctt ttgtatgtct gaaaacgtct ttatTTGCC ttcttttttg ttgttgtgt 16500
 ttgtttgtt ttgtttttt gagatggagt cttgctctgt cgcccaggct ggagtgcagt 16560

gggtgcgatct cagctcactg caagctctgc ctcccgggtt tgccgcattc tccgcctca 16620
 gcctcctgag tagctgggac tacaggcgca tgccaccatg cccgtcta at ttttgtat 16680
 tttagtagaa acggggcttc gccgtgttag ccaggatggt ctgcatactcc tgaccttgt 16740
 atccgcccccc ctggcctcc caaagtgcgtg ggattacagg cgtgagccac catgcctggc 16800
 ccccccgttt tttttttttt ttcagtaactt taaaaatttt gcccctctga cttctggctt 16860
 gcattgtttc cagtgagaaaa tctgctacta ttttatctt agtgtctctg tagtgtgtct 16920
 tggttgcttt taggatttc tctttcatt ggccttgagt ccctccttct tcccctcaca 16980
 tgtggggact tttaattcca tgtatattag gctgcatgaa gcttcccac aacctactga 17040
 tgctctttc attagaaaca tttcttactc tgcgtttcat tttggatagt ttctattcct 17100
 atgtttcaa acccaccaat aaaagattct gcaacatctg acctgccatt aatcccgcc 17160
 agtgtattt tcatactcctg tattgttagtt ttcatctcta caatccagct tgagccttg 17220
 gttatatctt ccatgttgct cctgcactgt ttgaacatgc agaatggcta gtggggcagt 17280
 gagctgagga gaagggacag agggaaagct cagctgttgg gtctacgggt atgatggaga 17340
 ccatgcagct gaaagtaaac cgtcaccct tctgcttcag tgtgaaaggc caggtgaaga 17400
 tgctgcagct gatgaggctg ggccttaggg tgccgggggt ggtggaaatct gcttgtggc 17460

gggagatgt gctatgtggc tataaaggat gaagatgaac gccctgtttt ctttcagcc 17520
tcgcttggat caaggtaaaa aggccggttt tggccttctt ggtggaaagaa agagagagat 17580
aaggcactgt cctccccttc ggagggcttg gggatacact aatccatcaa aaccactgag 17640
ggctgggcgt tggtgtgtgc ctgtggtccc agcacttgg gaggctgagc tgggaggatt 17700
gctttagcccc aggaggtaaa ggcgtaagca agctgtgatc gcaccgctgc acaccagtgc 17760
ctgggcaaca aagttagact ctgtctctt aaaagaaaaa agaaaaaaaaa gcctttttt 17820
aaattaaaaa aaaaatcaag tctacctgaa tggcctgcag ttggacccac aaaccaggta 17880
cccaaggtag caggcaaggc agctgcagtt gtaccagtca gaagtccaca agatttgaaa 17940
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaag cctcaggggt ttcagtgaat gctgtgttaa cttttttttt 18000
tgagacatag tttcactctt gttgccagg cttgagtgca gtggtgccat ctcggctcac 18060
tgcaaccctct gcctcccggttcaaggcagt tcttctgcct cagcctcccg agtagctggg 18120
attacaggcg cccaccacca cacctggcta attttgtatt tttagtagag acgagcttac 18180
actactggtc gtgaaactac agttggtcag gctggtctcg aactcctgac ctcaggtgat 18240
ctgccccctt cggcctccca aaatgctggg attacaggcg tcagttacca cgcccagtct 18300

gcttgtaac ttctataagt cagatgttg atgtgaccga gttcaaggct gatacagccc 18360
agagccagga caggtcgaga gctgccatt tttaggcct cagacttcct actggagca 18420
tcgcagcccc ttctgaacag aggttggag aaggtggtc atttggagag aagtgaccta 18480
aactatccta gttgaaggaa tctatccttg aaagtcatca ttgaaggaat tcaaaaagag 18540
aaaacttaag ggaaaggaaa aaaatagttt taaattttaa agagtggca tgtggagag 18600
gggttggaga tagtttaagag ttataggaaa acatttccaa ttaatatgag gagaaatttt 18660
atattggag agtccccaaa attaaatggc cacttggaa ggcaatacat tcccagacaa 18720
aggcaccagg cataggtgaa cacttggta ggttgttatg aaggagactc aaacttcagg 18780
taagcaggta gaacaaattt catabaatat ctttcctggc cggcatggt ggctcacgcc 18840
tgtaatccca gcactttggg aggccgaggt gggcggtatca tgagatcagg agtttaagac 18900
cagcctgacc aacatggta aacccatct ctactaaaaa tacaaaaaaaa ttggccggc 18960
atggtggtgc gcacctgtaa tccagctat tcaggaggct taggcaggag aatcgcttga 19020
acccaggagg tggagggtgc agtgaggccaa gatcacgcca ctgcactcca gcctgggtga 19080
cagagctaga ctccatctca aaaaaagaga aaaaaagatc cttcccacac caaaagtctg 19140
tagctgtgaa aagtagctac catatagtgc aagttgagat gcataagagg tttataaaac 19200

caccctggag tcgaaggaga gagaactttt ggttagggagt aagtaggtaa aaaggaccc 19260
aaaggtctgg gatcttgaac actgaaggag gaacagtgtt ctgtgagaaa ggtttgtttt 19320
taacatgtta atttcttcaa caaaccattt gaatacttaa tgggtccaa gctctggcc 19380
aggacccgga acaacaaaga caaaccagga ccaaagcccc tgactgacgg agttctgcag 19440
tttagttacc gagacagaca catgaacaga tagttcatca tatgtgataa ggtggagtta 19500
gggcacacaa gtgaggcatt taagcaagga aataaaaata aaaaagtatg gaatagttag 19560
aataaccttt ttattgatct ttctgctaa ttctgacatc tgtgtctgtt ccaagtcagt 19620
ctccatttgac tgatTTTTT ttgtccctt tataggtgta tttcctgct tctttgttg 19680
actggtaatt ttgggtgaa tgccagacac ttaatttac ctgttggt tctggcatt 19740
tttgtatTC tagaaatact attattgagc tctgttctgg gatgcagtta ttaagagtca 19800
gtttgatcct ttgggtctt ctgaaaaaga ttgttaggt gggtatggag cagtcccag 19860
tctagggcta atgattctca actactgggg catgacccaa cgccccagga attatatgct 19920
tttcccagtc cagattctgg gaacaggcac tggccctgc cctgtgtggg ctctgtcccc 19980
tccagtcctt ccaggtgggtt ctgtctggtc tcaggttagtt tcccaagaca catgcgccga 20040

tcagatctct cagattctct gggcagcccc ctccctactg tcttctgtgc atgacacctg 20100

gctgcctcag tcicccccag ttctcagccc tctccgtgc tggattctcc ccatcttccc 20160

cagcctgcag tgctgggtcc tggagactcc ccagggctca ccatgtttgt ttccctctc 20220

tcaggtcctt ttttacactga catggagtac ctgaaagccc gtgtttcat gcattttacc 20280

tgggttttgg gtgtttcag ggggagggtta aatctgggcc ctgctgctcc atcgtggtca 20340

gatgtgggag ttacacactg gcacacactggc ttttttttt tttttttt agacagggtc 20400

ttgctctgtc acctaggctg gagtgcatgt gcacaatctt gactcaactgc atcctccacc 20460

tgctaagctc aagccatccc cccacccitag cctcccgagc agctgggacc acaggcgcat 20520

gccaccacac ccagctaatt tttgtatTTT ttgttagagac agggtttgc tatattgccc 20580

aggctggtct caaactccctg ggctcaagca atctgcctgc tgcggctcc caaagtgttg 20640

agattataagg cgtgagccac tgtgccttgtt ggacatttagc ttttttttt ttttttttag 20700

acagagtctc gctctgtcac ccagtctgga gtacagtggc acaatctcggtt ctcactgcaa 20760

gctccgcttc ctgggttcac accgttctcc cgccctcagcc tcccgagtaa ctgggactat 20820

aggcacctgc caccacgccc aactaatttt gttttgtat ttttttagtag agacagggtt 20880

tcaccgtgtt agccaggatg ttctcgatct cctgcctcg tgcgtggcc accttggcct 20940

cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc gctgcaccca gccaaagcaaa atggattttt 21000
aaaatgaact cttacaaaac tttgttctaa tcttgcttc taatagccac gaatcaaaca 21060
cttccttgg cattttaggg ttcatagat ttgtgtgtgc ctgggaggc agtcaagtcc 21120
aaggcctgaa gtttgctgat gcagtgccta agcccgggca aatggaagct tgaaattagc 21180
cctagctaat gtttttttt tttttcttt ctttctttt tgagacagag tcttgctctg 21240
tcgcccaggc tggagtagac tggtgtgatc tctgctcact gcagcctctg cctcttggc 21300
tcaaacgatt ctcttgcctc agcctcccggtt gtagctgggg ctacaggctt gcaccaccac 21360
acctggccaa ttttttaatt tttatttta gtggagacac gtttaccat gttggccagg 21420
ctggtcttga actcctgacc acaagtata caccttgcctc agcctcccaa agtgcgtgg 21480
taacagggtt gagccaccat gcccggcctt ggctaatgtt ttctgagttt gccccagaac 21540
ctgtggccctt gggtgccac actgcgtggctt gggagggcaa ctgggtggctt ctgcagcggg 21600
aagtgtggtt tggagtcagg tctcggttcc ttgtctgggg ctgggtccacc ctggggctgc 21660
tgcgtactt ctccgttgc ttgggttcctt ggtcctgaga gtgaggcagc gaatgccac 21720
ctagggggctt ctggctggga tggaaagggg caagggagag cctctgagtc aggagccattt 21780

cccggtgagt ggctacctgg gggatgccac ccagggatgc ttgggtggc actggccta 21840

tggtaaacgt gaacaatgcag gggcaggatgg ggctigatgcc agcactgtga ggggtggatg 21900

gtacaaaggc tgccggccct gagaggtctg agggctcctg cctgtggca gcgcagctgg 21960

gtgggcagtg ccagaaagag actggaagac tcaatgcaga gccagcaggc agcgcagctc 22020

agcaggccag agcgcagagg cagatcaggg gtccctagca ttgcgcagct cagccactgt 22080

gtgggcagcc gcaggcccag gccctgcccc cactcttctg gacctcacaa gccctgagga 22140

gtgcctgttc ttgagtcctg agccagctcc ccatgctcac ctgctgctct cttatcctt 22200

ccagccgccc agctgggaag gaaggtggtg gtggtgact acgtggaacc ttctcccaa 22260

ggtaggcagc accctatggg agccgggtgt cctggggaaag gaggtgggag gtggcccccag 22320

ttcctgtaca gagggcagct gacaccaaag tccttcagcc ctgctgtcca tggttctgg 22380

acagtgtcct gtttcaactca tcattacttt aaagttcttg accattatcg aaaacaactc 22440

tggccaggtg cagttgtca cgccctgtact cacagcactt tgggaagcca aggcaaggct 22500

tgatcacttg agcccaggag ttcgaggcta tagtgagcta tgattgcact actgcactcc 22560

agccctggta acaagagcaa aactccatct caaataaata aattaataaa tattaaaaag 22620

taaaaacaac tgtttttatt ttcgagtaca gttatagaga gcagattcgt gtggcatgtc 22680

agctggtctg tgtagatgtt acaaaggcaac tttaggaat tccaaacact cttagaagaac 22740
aggaaagcct ccagcagtca cctgaacata aattcaaatg tgctttccc acgtcccagg 22800
cacccggtgg ggcctcgccg gcacctgcgt caacgtggc tgcattccca agaagctgat 22860
gcaccaggcg gcactgctgg gaggcctgat ccaagatgcc cccaactatg gctgggaggt 22920
ggcccagccc gtgcgcattg actggtaagg atctggcgcc gtggcattcc agtgctttc 22980
ttctactctt gggtggaaga ggaagaggag gcttatcctc gatgagccct catggggagt 23040
ggcccgtagg atgggtttct cagccagggg cgactctgcg ctgtctgcct cagacattt 23100
ggaatgtctg gagacagttt tggttgtcac tgggaaggg ttgcattcc ttgcgggaa 23160
gcccagggat gctacagcca tgcacagcac agccccacca agaacagtgc atctccaagg 23220
ccaggagtgc gggtgaggcc cgcttcagc tgagctttc tgggaagggg accacgtggc 23280
ccagccacac ccacattggc tcagataggc ctctgcctgc agtggtagc ctttgggca 23340
cagagcagct gcatctggag agccgtgggt cagagccct gtttctgtg agtccaaagg 23400
tctgcagccc tgagcctggg acaggcggtt gcacgttaggg atggatgtca cgtttggca 23460
cctttaaaag cactttgtt tttagatatt tctatgaatg taccatttga atctaata 23520

ccatcgtag gcccgcagc taacacctgt gtgggatt ttacatting tticgtatct 23580
tcacaggagg aagatggcag aagctttca aaatcacgtg aaatccctga actggggcca 23640
ccgtgtccag cttcaggaca ggtactgaag ctctctccgg gaatgggccc ccctctggc 23700
cttctcttgg gcgttctgtg cctggacaca cacttacita ctgtgcagag catgtctgg 23760
caggctctgg gggttcatgt cctgctcatg ggtggggatg aggacaagga gcagatggga 23820
gtgactgtag gggaaaggaga gactgccctt tgctgctgag cagagcctgg aggtgctgcc 23880
aaggaatgag tgaggccaca ttggcagaat ggccagagcc cagggctgca cagggaggag 23940
gcgccttgggg ctggaaggcc tcaggccaga gagcgtggac atagcttaggc ctggggctaa 24000
tatgtggtga gggtcatccc agtggcaagc ccccaccccg tgaacccct tcttactgca 24060
cacctccagc tccttgggtg tgggtgcagg agcttggtgc ttccctgg agcaaatgtc 24120
cctacttgtt caccgttccct gtcagccctt gggatctcc agcacagagg cctatgctcc 24180
cctggcctac aaccttctcc tggggctcag ctgccagcac agcagatgcc tgaaacttgtt 24240
accgcctctg gcccagcctt tctccgggg ctgtggaggg gacagtggtc ccgcagaggt 24300
ctgggtggctc tcctcatgca ccattgtttt ggccccaggg cgggtcttcc tggggcttca 24360
cagcaggcag cagttttgtg ctcactaaat ccaggaaagt ggagccagga agccaactgc 24420

ttgcctcca cctggacctc acaagctctc ccctatccag ggagctaagc cacattgtgc 24480
 tgtggcattt ctgtgtttct ctgtgggct ctgtatcccc tggtagtacgtt tcctggggac 24540
 agcaggctct gccctccctc ctccctgccc tggcagctc ctggacggc accaaacagg 24600
 cccagcccac tgccctgctcc ggagccacct gcagaaggag gctggggcgc acctggcgt 24660
 tttctgcctt ttcactcttc taaaagtgc tgccatgagc attgcccggc tgtgtcccg 24720
 ggcagcttcc tggctgtcga ggtgattgaa gggctcttgc tgttaggaact tcacgcagct 24780
 cagacagccc atagaggcac aggcttgcca gtggggagaa ggcaggctca agcaggaggc 24840
 agagccttcc cagaaccctt gctgcagcac ggtccttttgc tcattagaaa gtgttggcgt 24900
 ggtgcagttgg ctcatgcctg taatccatgc actttggag gctgagggtgg gaggatcact 24960
 tgagcccagg agttggagac cagcctgagc aacatagttt tattgtaca tccctacaaa 25020
 aaataaaatg aactagccag gtatggttgc ccatgcctat agttccagtt acttgaaca 25080
 aggcttccgt gagctatgtat catgccactg cactccagcc tgggtgacag agtgagaaga 25140
 tgtctttaaa aaaaaaaaaa aggggggggg ggggtggctc atgcctgtaa tccttagcact 25200
 ttgggaggct gaggtgggtg gatcacttga ggtcaggagt tcaagaccag cctggccaac 25260

atggcgaac cccgtctcta ctaaaaatac aaaaattagc cagggcggtt ggcgcaagcc 25320

tgtaatccca gcttctcagg aggctgaggc aagagctgag gcaagagaat ggcttgaacc 25380

tgggagggtgg agatitgcagt gagccaagat cggtccactg aactccagcc tgggcgacag 25440

agttagactt tgactcagaa aaaaaaaaaa gaaaagaaaag cgtgggtcat ttgtttctgt 25500

gcactatgct cccagccact gttttgccag ctttgtcatg cccgttctct tggtgttacc 25560

acacccctga aatcagaagg tgacaccatc tggtgccac cacagctccc tgctggaaca 25620

tgtccgggtg atgaggactg tccccaaagag aggtccagcc acctttgt gcacaccagg 25680

gctgtacgtg gcctcttagg accgtgctga gctggcttcc gtccctgctt tgacacctgt 25740

ggtaacaatg tccctggat ccctggggga caggcgaggt gcccccacat cccctccatg 25800

cttctcagca tggttgccgc ttacctcttg gtccatctga gccacagcac caggccctgc 25860

tgggggctgg agctcccttt taccagtgtt ccctattgtat ccagttggtg aggttaatt 25920

tgcagaggaa gtgtttgaaa atcttatctt tatctttcag aaaagtcaag tactttaaaca 25980

tcaaagccag ctttgttac gaggcacacgg ttgcggcgt tgccaaaggt gggaaagagg 26040

tgagcatctg acttactcgc gtggctcctt gtggaccctt ctgcagacct tgggcaccaa 26100

ctgcagctgt gttggcctg ggtgctgttc tttagtaacac gtgctgctgg aatcaaaaag 26160

gtggcttc ttgaggctgg gcacttgct ttaacgtgat caaataattt gctgccctgc 26220

tgctcgagg ggcattggcaa cagggttgtt gaccacaccc ttttgcagg atttttggg 26280

gattttaggg tgccattgaag tgcttggagt tagaacatct ccctgtgctt tctgcctgtc 26340

cccccttcgc caggctgatt gtttatggga ttccagctcc atagggcctc tgaactgctg 26400

gccaagggtc cacgctacag ggcaggggcc gtgggaactg ctggccaagg tctgtggtgc 26460

tcagggccctc cggtgggggt gatcaccatg cacctgtctg acccacggct ttctttttt 26520

cctcctcagat tctgctgtca gccgatcaca tcatcattgc tactggaggg cggccgagat 26580

accccacgca cgtgagtgtc cccagagcat agcgtccctg ctgccgtggc ccattcccg 26640

cctctttgag ggatacgttt ttacacacgt gcttcccaca gcagcagctt gcacaccctt 26700

tccccctata ctcactatca tcactttctg ctttccaatt ctcttgaatc cacactgctg 26760

aaatgtgggg tccccagtgcc cctccacgct gccagatcct caggacagct ctcgttctgc 26820

tctccccctg ccccgctgga tctgtccccct tccacaccag gatcctgctt cctaagtctc 26880

cattgctgat tccccctttt cccttcagcc tcagaatgtt ggaacattca ggatataagc 26940

ctcatttttc atcttcctcc ttcacgtccc ccagttaaa aaaagttga aataaaaattc 27000

acacgctata aaatitagcc ttttttaggg tacaaticag tggttttag tacattcaca 27060

gagctgtcg gccatcagtc accaccatcc attgccagaa ctccctccat catccctgaa 27120

ctgaaactat tcccattaaa ccctactccc cagcgctcc tccccagcc cctagaaacc 27180

accacactt ttctgtctt atgaatgtga caacactagg cacctcggt aagtgaaatc 27240

gtacatgtaa gtccttctca tctaactggt acgtgtgtt cccttagtga ctcgtatgt 27300

tgtgtccctt agtgactggc ttacttact gaggataaca tcctccaggt tcacctacat 27360

tgttgtgtt gtcaaatca ttcctttta tggctagata ctattccatt gtatggatag 27420

accacacttt gtttatctac ttgcgtggat aaacacatgt gttttcca ctttttagct 27480

attatgaata gtggcgctgt gaacatctgc aaagaagttt ttgggtggac ttcagtttc 27540

acttcttttg gtttacactt aggagcagaa ctgctgggtc atgtggtaac tttatgtga 27600

atctttcaag gaacgtttca aggaacctca gactgtttc cacaatgact gtgtttaca 27660

ttccttccag tgggtgtaa gggcatgggt ttcttggat ttcacgtatc ttgtatattt 27720

tttattgaaa gctgaacatt tcaaataatt taatgcgata actttggaaa ccagattctc 27780

cctctgcccc aggattctgt ttttacagct gcttatttgg tgactttcg gaactgactt 27840

tgttagactct tatttttga tgtatgtggc cactgaagtc tttacttggt tagcttagtg 27900

gtcagctaag aactgcatgg agatttccct aaactaagaa ctctcccggt ctttgctgag 27960
ggctctgtgt gcgttggag gggatgcctt ccacactcaa caggcagcag acagctctgc 28020
cctagccttc acttcctgct tctgcagaga tcaaggtcag ctggaggtga gggttcaggg 28080
cctcgtttgt ccttcctgat gtgtgcacag tgctgtgcat gcgcctggcc taggttccca 28140
ggaatatgct ggaaccttccaa agactccag cagacatctc atactttggc ttttccttgc 28200
aagcttttg ggcagtctgt tggtggctct aactgttacc tatcccctca ggcagctgtg 28260
agaagaaaaac ctcagacaaa tgccccaga gaaaggcttt tagccctggc tgagctccgg 28320
tgaagtttga tgaagatgac cctatagttg ctgactctga ctcttcttgc tggggggc 28380
ttgaaagacc ccagctgagt tctgctctct ctgacacatc actgttcagg gctgccgctg 28440
agggtggagt gggaccagag tgagttaaaa caccctggag ttccattct cactcagctt 28500
cagctgttt tcctgacttt aaatgttccc tgtgttgctg caaggctgtg gtttaattcc 28560
ataattctga atctcccaagt tcttgccagt ttatcgctg ttttaacag agaggtgaat 28620
aacccctggc ccagcttgtt gggtttgtgg ggcagagttg aggaagggc cccgggtga 28680
ggggttgggg ggcagctgca gcagggaaag caaatgggtt ggggtgagc agagaggttt 28740

ggctgagacc agtccccacg ggtctccag ggaaccgtgt gccgcctgct ccaaggctct 28800
aaggtaggctg cagccaagct cttaagacc acggctctct cggcctggag gccacaccac 28860
ctctgactta gacccagggg cagtccggtg gaggcagagc aaggggaggt tctgccactt 28920
cttggatgtg accccagcct ccacttcgtc ctgigcttac tgtggaaaca gggaaaggag 28980
cgcccccgag gaggcacaagc acccccagtc cttagaggcc gtggacttg tctggccgcc 29040
aggcagccac agcagccctct agagggggca ggttgcttat gcacagaggt ggggctcagg 29100
gctgcgtgac ttgttaggat gacactgtgc agtttgtcaa ggcagctgct gcagacaggg 29160
tcccagtgtat cccctctcctt ggcagctggg ctcatggtgg ttctgcttaa agaaggccac 29220
agccagcttc cagcagccca gcggtcattt ggtttctctg aggccccagg cagagctgca 29280
cgtgcatccg caccagggag cactgcacag gggccctggc ctggccggc cctgctctgc 29340
acctcacggg cagctgctga cggcttttg ggctcacagg ggatccagca ggctccctg 29400
gtccttagga ggcaggcagc tcagggctgc ttgcctctcc ctgccacgcc ctcccaggg 29460
gtctgcctaaag gcttgcttgc gttttagtcc ctttgattgc cagacccctt ggtttccctt 29520
gagtaaacct gagaaattcc tgactttatt ttttttgcc agttgaaagc ataaaactgtt 29580
tgagatccgc ttccctccacc agcacatctt gttctcatgg ccgctaaggg gacgttcacc 29640

ctgggcctcc caccgttgtt gcccgccttc ttcaaggtagc ctgtatgatt tctggctca 29700
gagcccaccc gggccagccc tcgagagtgt gaagtccgtc ctggcttcag ccaggtgcc 29760
tcagagctgc ccctcagttcc ctgcccacct cagccgtgtt cacttacccc ctgtgcctcc 29820
tctcctctgg ctggccttgtt aggccacccc tgccgcgcag acacacctga gctctgctgg 29880
ccctgatttg ctgacctgtt ctctccccac ttccctcttc tgagtttggaa tccccagaa 29940
cccaggtgtt gctccctggg gctgcattgcc cctgtctgtt tgatgtgtct gtccagaacc 30000
cgggcagact tgaggggtcc cagctgtctg cctgtatggc ccctgcagtt gctgtaccca 30060
cctcaggccc tgtatcctgc tctgaaccag ggtcaagggg agggtcctgg ggaacagagg 30120
ggaaaggtac cctgcgaggg caccgggacc tggagtgcag cagcttagat gcagacagggc 30180
cacctgcagc cccaaagagg ccacagcctg cagacaagga ctggcagcag ggaagccctg 30240
tgcatgttgtt ccctggaaa gctctgttgtt attctgcaaa gctggcatcc tctttaagga 30300
agcccttagga caggccaaat ggagctttg tccaagggtt catttctgtc ttgacagatc 30360
gaagggtgcct tggaaataigg aatcacaagt gatgacatct tctggctgaa ggaatcccct 30420
ggaaaaacgt aaggcctgcg cgtgcttggt ggggtccctt ttttgttac cagagtggc 30480

actggacct tagagccgt gctggtgctg ggctccctggg gctttcttc cggtttaccc 30540

aaaagaagga aaaaaggcct gttatttgtg gccagggtgtg gtggctcatg cttgttagcc 30600

tagcactttg ggagactgag cgggaggatt gcttggaggcc aggagttcga gatcagcatc 30660

agcctgggca atatagttag acctctactc tacaaaaatc tgtttggtt tttttttgg 30720

ctttttttt taggtggagt ctcactctgt cgcccagact ggagtgcataat ggcccaatct 30780

tggctcactg caatccctgc ctcccagggtt caagtgattc tcctgcitca gcctccaaag 30840

tagctgaaat tacaggcgcc caccaccaca tctggctaattttttaattttttagtagaaa 30900

tggggtttca ccatcttgggt caggctggtc ttgaactcct gacctcaggt gatccgcccc 30960

cctcgccctc ctaaagtgt gggattacaa gcgtgagcca ccacacccag cctacaaaaaa 31020

tctgaaaata ttaaccgagc atagtactgt gcacctgttag tcccaagctac ttggggaggct 31080

ttaggtggga ggatttgcttgc agcccaggag gttgaggctg cagttagctg tgattgcacc 31140

actgcgcctca gcctgggaga gtgagacctt gtctcaaaac taaacaataa acctgtgact 31200

tgtccccctc tgcaggcgttgc ttgatttact ctgtccctgtg gctgccttgg aggtataataac 31260

aataacagga ctgccatata aatggagtc gctgtttgtt atctaggta gtggttgtca 31320

aatgggggttc ccaggagccc tggggttccca gtgggtcccc tcaaggacat cagggagaac 31380

at taaggagg ggagagccag caatccatat cccagcnctc atctaaccacc ctcactgtct 31440
tctgatttgt acattgggtt tccctgaaat ctagcaaaga ctccaaaggc ctcagaaaca 31500
acatcttgat tgtggaaagg aggctagcag cgtgcaagt gctctcaact cccatgggag 31560
caggtgcaga gtcactaagt gcattccgat gcccacagag tggccatcc cgaggtccca 31620
ggtccaggca gtcctgcct gtgggtgtg gagacttcat gttggcaggg agcagagaga 31680
ccaccagagg gcggcagagg cttggtaat agcagtctcg agcctcccc aggagaaaat 31740
atcagtggaa aagggtccca cttctgtgt tgcccgaatg tgcattgggt gcgtgcagat 31800
gtgtgtggtg ttttgtgtgt aatgggtgt gtgggtgtg ttgtgtgtt gtgtgtgt 31860
ggtgtgtgag tggtgtgtgt gtgtgaaggg tgggtgtgt tggtgtgtgt gtgtgtgag 31920
ggtgtgtgtg agtgtgtgt gtgtgggtgt tggtgaagg gtgtgggtgt gtgtgggtg 31980
tggtgtgtgt gtgagtggtg ttttgtgtgt gtgtgtgtgt ggtgtgtgt gtgtgtgt 32040
gigaagggtg tgggtgtgt tggtgtgtgt gtgtgtgtg tttgtgcgtg gtgtgtgtgg 32100
tgtgtgtgag ctttgtgtgt gagtagtgtg tttgtgtgtt gtgtgtgtga atgggtgtg 32160
tatgtgtgtgt gtgtgtgtgt ggtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt tttgtgtgtgt 32220

tgigigiggg tgigigiati gtagtagtgt gigagtggtt atgigigigt giggtgigt 32280
tgtgtgagtg gtgtgtgtgt gtgtgagtg gggtcacat gctctgcitg tcattgttc 32340
acacttcacg gggcatcttt gtgtgggtc aggactggat tccctgaat ggatgtggta 32400
tagttccctt gaccttctc ttgttaatga gcatctcagt agtttctctt cttcatcatt 32460
atcaatgctg cagtaaaaac ctggagggtg catctgttta ccatcagaag tgcttctgac 32520
acatttccc aattattcat tgtgataaaa cagacatagt ataaaattta ccacttaac 32580
ctttttttt ttttttttg aaacagagtc tcactctgtt gcccaggctg gagtgcagtg 32640
gtgcgatctc ggctcaactgc aacctctgcc tcccggttc aagcgattct cctgtctcag 32700
ccctctgagt agccggact acagggtct gccaccacac cccgctaatt ttttgtttt 32760
ttagtgaga tgggtttca ccatgttggc caggctggtc tcaaactcct gacctcaggt 32820
gatccacctg cctggcctt ccaaagtgtt gggattacag gggtagccca ccacgccccag 32880
cccacgttaa ccattttaa gtatacagtt caatggtatt aaatgttata ataatgtcgt 32940
gaaaccatca ccactatcca tgtctgaaac tccttcatc catgttgtat ctgcatttcc 33000
ttcttttaa gactgagtaa tattccattt tacaggcaca ccacatttttgcattccattt 33060
catctgtcag tggacaccca agttgcctct gcttcttggc tggtagtgc agtgctgccc 33120

tgaacatagg tgtgcaaata cctcttgaag acctttcagt tcctttggat gcaaaccagg 33180
aagtgggatt gctggatctt atggtcttga ggaacctcca tcctgttccc aacagcgccc 33240
acaccatctt acattctcac cagcagttca ggaggactct gggctccccatcctcgcc 33300
agtgcattt gttttctgtt tttctttctt taattttat ttttccttt aaactgtttt 33360
cttgcattttt tctgttttt tgacagtggc catccttagtg gctgtgaggt ggtcttatac 33420
gctttacaag gggagctgcc cttccgtctt aacactttgt gctgacaggc caattccatg 33480
tgtactctgc ctgcattttt gtccttgta actcaggcat cagcttttg ataagacaca 33540
aaacagaaaag gagcctctcc tcccatacccttggcctggg cagtggtcac tgctaccat 33600
ggcgccccaca ctctcctgag agcagtcact gctacccacg gcgccccacac tctcctgaga 33660
gcggtcactg ctacccacgg tgcacccaca ctctcctgag agcagtcact gctacccacg 33720
gccccacac tctcctgaga gcggtcactg ctacccacgg cgccccacact ctcctgagaa 33780
cggtcactgc tccccacggc gcccacactc tcctgagagc tgtcactgct acccacggcg 33840
ccccacactc cctgagagct gtcactgcta cccatgggti gcccacactc tcctgagagc 33900
ggtcactgct acccacggcg cccacactc cctgagagcg gtcactgcta cccatggcg 33960

ccacactctc ctgagagcggtcactgctac ccacggtgcc cacactctcc tgagagcggt 34020

cactgctacc cacggcgccc acactctccct gagagcggtc gctgcgtaccc atggtgcc 34080

cacactctcc tgagagcggt cactgctacc cacggcgccc acactctccct gagagcggtc 34140

actgctactc atggtgcc cacactctcc tgagagcggt cactgctatc cacggcgccc 34200

acactcctga gagcggtcac tgctacccac ggcgcccaca ctctcctgag agcggtcac 34260

gctactcacg gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg ctacccacgg tgcacccaca 34320

ctctcctgag agcggtcac gctacccacg gtgcacccac actctcctga gagcggtcac 34380

tgctacccac ggcgcccaca ctctcctgag agcggtcac gctacccacg gcgcccacac 34440

tctcctgaga gcggtcactg ctacccacgg tgcacccaca ctctcctgag agcggtcac 34500

gctacccacg gcgcccacac tctcctgaga gcagtcaactg ctacccacgg tgcacccaca 34560

ctctcctgag agcggtcac gctacccacg gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg 34620

ctactcacag cgccccacact ctccctgagag cggtcactgc tacttacggt gcgcccacac 34680

tctcctgaga gcggtcactg ctacccacgg tgcccacact ctccctgagag cggtcactgc 34740

tacttacggt gcccacactc tcctgagagc ggtcaactgatccacggcg cccacacccct 34800

cctgagagcg gtcactgcta cccacggcgccacactctc ctgagagcggtcactgctac 34860

tcacggcgcc cacactctcc tgagagcggt cactgctact catggtgcgc ccacactctc 34920
ctgagagcgg tcagtgctac ccatggtgcc cacactctcc tgagagccgt cactgctacc 34980
catggcgccc acactctcct gagagccgtc actgctatcc acggcgccca cactctcctg 35040
agagcggtca ctgctactta cggtgcgccc acactctcct gagagccgtc actgctaccc 35100
acggtgccca cactctcctg agagcggtca ctgctactta cggtgcccac actctcctga 35160
gagccgtcac tgctatccac ggcgcccaca ccctcctgag agcggtcaact gctacccacg 35220
gcgcccacac tctcctgaga gtggtcactg ctacccacgg cgcccacact ctcctgagac 35280
tgtgctgagc ttgtgctggt ttccatcgac tgcctgctgc cttccattgg acccactgat 35340
cgtggtttgt cttggactt ggtgatagta tttcatgcag aaattttaag tttttctgtt 35400
gtcacaccaa tcacttttc ctgttatgcc ataattctg ggttatctgt tttttatct 35460
ttgagacagg gtcttgctct gtgcggcagg ctggagtgca gtggtgcgat catggctcgc 35520
tgcagcccttg atctcctgga ttcaagcaat tctcctgcct cagcctcctg agtagctgg 35580
attacaggcg ctcgccacca cgccccagcta atgattattt ttttttagggc aaggactcgc 35640
tatgtggccc aggctagtct tgaactcctg ggctcaagtg atcaccctgg cccctcaaag 35700

tgctgggatt acaggtgtga gctacggcac ccagactgtt ttttaatct ttgactatct 35760
gctgagttac acatgatctg acitcgttg cattigctgt gatcagtggtt ctttcacac 35820
atttaccta aaagcctcggt gtcacagcct cattttagat gagcgtgtct gtgagcatgc 35880
ccatgtgtgc tgcacaaaatc gccagcatgg tccttgcctt cttcacgtc tggctttct 35940
cttcttttat ctcttcttac cttccagctg gtttgttat tagggatgtg atccctgtc 36000
gcttgtggtg cagatttct cagcttctag tgtctttaa ctttgtgtat gtacaaatgg 36060
tttaagttt tttaatgtt acttaaatct ttacactta gtggctttt gatttattgc 36120
atgttcagaa aggcctgccc cacccccaaag atttttttt ttttttttt agccctgtat 36180
tttccttatg ggccgtccaca agtcggattt tctttactt cttgggctg gctgcacttc 36240
ttctgcggtg tggtgagat gggttgcccgg ggccccagtg cccatctcga ggcactgttc 36300
tcactcggcg tcctgagttc tgccctgtgcc tcgttgtgtc tttcacgtag gttctctgg 36360
gtggagtctg gatccccctc cagccccctgc aggatgtttt gtctgctgga ctttcaggga 36420
aatggccttg gatgtctggc agccccagga tgtctgctgg gccccctcgat gtactgggt 36480
cttcggtgac ggtcactgca gcccagcaccc ttaccacccc tcgttgtgcc tttccccctc 36540
agaggctgcc cgcttgggcc tggggagggg gcccggtgct ctgggtgccccc tggccttgct 36600

gtctccctag caaggtagt ggggcttggg gagcgctcct ctgcaaccct gtgctggggg 36660
cagctggctc ggccgggaag acacagctcc agatattttt ttcagaaaag aaactgcagt 36720
gtttatttc ttcagaaaaaa aaacatttag aagattttt ttaaagctct ttcgtttaga 36780
aggaatctag gtatgttatt gttaagaaa aaaagtgttt gcaatgtatc agtcacccgt 36840
ttcattctga gcatgattta tgtgaggaaa tggttttttt aaaaattaag ctggagatat 36900
atccctgtac gatgcttctg taaaaatgctg gctttgtcc ggcgctgtta atgcaagttt 36960
taacagtgtta atatgggagt cagtgttac atttacatt cctctgctgc agtcaaaata 37020
agcccggagg gtctacagta gcatttctgt attttatcag cttgggctgg ggctgagggg 37080
aggccctccac tcacacttgg aggggctgtt tctgccagat ttatttgcttataaatatt 37140
ccccatgttt atttaactc gcctttaaaaa tggagctgaa attaatatgg accccggggc 37200
tgctccccctg gcccctgagt gcctcccgta gtcgggtggg acatttctac ctggtcccat 37260
cctggaggcc aggtgcgcaa ctcacggtgc ctggcatcac agtccccctc ctgcagttggg 37320
caactctgtcc cctggttggc tcctccacca aggaggctcc ctgtccccct ggccccaggg 37380
ccicggtggg ctctgcggcg tgcacgagggc ctccctcgta cctctctact acaggcacag 37440

gctgccacca ggaactccctt tcagcgacg tctgtgggg gcccaactgcc gggagctcca 37500

gatctggcga gtggtgccca cagtggggcc tgggaccagg cctgcaaggt cgtaccatgc 37560

cactttgcc ccagagaggc cactcaggca tcacagtgc cctcggccc caagttggga 37620

gcccccttcc tcccttgtt gcatccaggt cttagggagc ccagggctgg acagatggca 37680

gaggcagggg gatcgtgtcc aagctcagtc aaggggagac agaattaaac agtgcacttc 37740

actaaacagc catatgttgg caaaatgggg ccataacctgt tgaccagagt gggctgagca 37800

cctggtttgt aacctaggag ggtgaggaag acgtgcagaa aactcagaaa actcctgaaa 37860

aagcagtgtg agcttgtggg tgggtgagca ggacccttga gtgcactggg gtggggcggg 37920

ggacgttctg gctccccac tcccatagcc acgccctggc gcaaggact gtcctccag 37980

tcttggtggg gaccctggga aggactccag gtcggctcct gctccgcctc tgccatgcag 38040

atgccccctt tgtgccagcc cgtttgcctt ttctgtgtg ttgtgtctt cttctctgg 38100

aactgcaaga caggttgaag aagagaggag gtttctgggg aggtacagt accctggca 38160

ggcagtggag cccctctggg aacaatggcc actgcaggga ggcaggggtg cggagggca 38220

cgtgacccca aatgactagg ctcagagggg gcatgcagcc ttgcaaacca aacctccat 38280

tccacagagc aagcccccgg caggtggagg aatgiggaag gcgaggatgg tgagcccaca 38340

ccggggagct ctttacaga ggcaggcact ggggtcggg atccaagtgc agccaagagg 38400
agcccggaggc ccagaggggc ctggcaatta aggggggccca aggagctgag ctccaactcc 38460
agtcccacag ccgcacaatc ttcctgccac ttccctgacct ggagggctgc ctccaccggg 38520
aagcctccgc acccggcagg gacttgggcc ccgccagtgt gccttgtctc tgcctcttgc 38580
acacccacgg ccctgggctt cgtcttctcc ctcagtgcca ggtttggag ctcaggtgcc 38640
ctaacccaa tatagggaat tgtggccct ctattctagt cctcccttt gctgtgtctg 38700
taggtccgct ttctgcaaag cagggctctg agctggcaac actggatgg ggccgagggc 38760
gtgaatgaga ccgcagcctc ctctcaggc cgataacgga agtactgctt cccggaaaca 38820
accagggtct gcctgttccct gctgccagct ctgtagcccc tgcccaggc cccgtgggg 38880
tttacagagc atggggccag cctctccctgc agctgccagg ctggctcagg ggctgaccag 38940
cccacacact gggccctggg ggaggggctg cagccagcca ggcctgtcca cccctctgagg 39000
ctgcicccacc agcctgctgc tgtctgtcct cgcactcctg gggctccaag aggcagatg 39060
ttttataac ttgggctggt ttaaggctgc ctgtcagtgt gtcatggaaa gagctttat 39120
ttgaccctta ggaagtccgg aagccagcca ggtactgcga tcattttct ctctccctaa 39180

gcacaagagg gaagaagata aatttatct tggagaacac cacagccatt tgggagaaaa 39240

ttaatttaa gtggcacatt ccgctggtgt gatggatgt ctttgttgc agcaataggg 39300

agaccagctg tcctccctggg gcttgttacc agactgcaaa gccctgcca cctctgttg 39360

tgcgtccctg tggctaagac atgacaaggt agggctttca gtggcatttg ttacagggcc 39420

agcacacaga ggctccggcc cagcatctgc ccctgagggg ttgggtgggg cggcggggtt 39480

ccagccaagc cgggaaagga ggccttcgta gcaccccccag ccctgtgctg cctccctggg 39540

gcatctgcag ctggcgcc catctggtat ttcctggct ggcaggacct ccaaggggcc 39600

aggtagccctcc catgagactc actttgtgtg agtattccct ctggagagca ggccttcaag 39660

ctcaagaggc agatggattt ctcttaagc ctaggcttcg tggcctgaa ttaatgcctt 39720

tgtttctgct tcctcccccc attccaattt tgaacaagaa agcctccct gtgattaggc 39780

tcatcctgca gtagttatta tgccttttg gaaaatgttt gcacaccaaa aagcacagag 39840

agctgagctg ctggatcac atggaaaact gatttttatt tgtttgcatt tgtttgcattt 39900

agagacaggg tctcactctg tttccgggc tggagtgcag cttaactgcag cctcaaactc 39960

ctaggctcaa gtgatcctcc ttccctcagcc tcccagtag ccggactac aggtgcatac 40020

caccatgccc cagtaattt tttagttgt agagatgggg acaagctgta ttgctcaggc 40080

tggtcttcaa ctccggcgt caagcagtct gtccacccgt gcctccaga gtgctggat 40140
tgcacacatg acccaccgca cccaaacctct gggtctttta atgcagcggt aagttgagtg 40200
gttccagccc cctaccccca ggtcctgtga gctggtcccc tgacttctgt ggccagcacc 40260
tctgacttcc tgtggccagt catggcttga gtgggttgct gcaccacgtt cctgtctgtc 40320
cctacccctg ctggccgtg aatggcctga agaagggtgtc ttaggtcccc tgtctttggg 40380
tactctctat ccctgtgatc tggaggcttt ggtgtctgtc ttatttgct cgggcatttt 40440
tttacttttag ctggctgaa cgaggtctc ttttggaaatt ctcgtatcct gcattctca 40500
aagggtaaac attcacataa tttgatcaat gcggggaggc gtacagtcaa aaccaatgtc 40560
gtcaataatc cttgctcatg acaacaagaa gaggccaaa atgaccctcc acacgagcga 40620
gacgtgagct ttttttggaa gatttcagcc gaacacatag ggtcaaggat gcccaactcg 40680
gaatatgccc actgcaccca ctcctcccta gctgtaccct cagttgtga ttcagagctg 40740
gcagctgagg gatggggca cctgtgactt tgaagggtggc ctttggcg ggagcttctc 40800
cttgtccccg tgggtgccag gacaggaggc cccggcactg ggggactccg agggagggcc 40860
tggagagtca cctgcccccg ctccaatcca ggcctgggtgg gtcagcatcg tgttaggaggt 40920

ggggatgtac acgtcggtgg cagagacagc aaacatttg ggcaaaatca ggagggtgtg 40980

ttgctgtatc cctagcaatg agctaggagg cccggagagc agcctggccc ccatcctgca 41040

gctgcagggc ccattcctgg agaagggttg gccttcaggg ccaggaaggc cctgacgtgc 41100

aggggcccag ctgcccacag aggggatgca ttggcctcac tctgccagtgc cctgcacagc 41160

ccagcagggaa gcatctagcc catgcacagc cacctctggg agcagggggc aaagggcacc 41220

acacaatggg ctctcgccca gttacaccct tgcatttagg gcaggatatg caaaggcagca 41280

gagttctgtt tatatttgca gtaactcata acttcatatc tttttttt ttttgtatg 41340

gagtcttgct ctgttgccca ggctggagtg cagtgcacacg atcttggtc actgcaagct 41400

ccaccccttg ggtttacacc attctcctgt ctggccctcc ccagcagctg ggactacagg 41460

cgcacatcgc catgctcagc taattttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg 41520

ttagccagga tggtctcgat ctcctgacct cgtgatctgc ctgcttcggc ctcccaaagt 41580

gctgggatta caggcgtgag ccaccgcacc tggccataac ttcatatctt aaacaaaagc 41640

ttgtacccctt cactgcatac agcaagtcca aaaagagttt ggtttcgcca ttttggaaatg 41700

gcacttccgt gtagagatgt gtatgtggtg cctatgtgtg tgtgcattgtg tgaaagtgcg 41760

tgcataccgt ggtgcctgtt tcccaagtgt tgccggccct gagcggggct gggaaatgcat 41820

ctctgcaatc ctgcttggct gggggtccca gggtccccct tcgctgtcct cacatgctga 41880
gtgaggcatg taaccacctt gtgctcagcc ggccaacaga gctctgtctg ctcaccctaa 41940
tcctgacagt ggtgcggttc tgcctccagc cacagtgagg aagctgcatt ccagatgcct 42000
cccgcagggc acctgcagaa tgattccaag ggatacacccg tggggaaa tggaattata 42060
tcattagtagc ctgctggat tagcaatgac attggccta tccgtcctta catcacctcc 42120
tcttgttcaa agactgaagg gtaatgtggg agcccaccca cgtgcagctg cccgcgtgg 42180
agttcttggt cgtgttaggt tctgtgcccgg ttgcattgtg tgtgcattca tgtgtctaca 42240
tgagtgtgtg catatgtata tatgaatgaa tgtacccatg cgagtatgtg cgtgtgtgt 42300
tacatttgta cccgtgtaa agtatgtca tgcaggtgtg tggcatgtgt gcacatacaa 42360
gtgtgcgtga gtacatgtgc atgcaaaaca catgtggagt gtgggttga acaatagagg 42420
gttttcacta caagagcaaa tatttccat gactgctgggt cgcaatgtcc tgtgctgcct 42480
cccttgcctt tggggtcctt cagtccctc tctggggagc tggccctcct ggccctgccc 42540
ctagctgtga tagggttggaa tgtgcctctg gcacatggaa gggcccagcc ttctgtggtc 42600
ttgagagatgc ttgttcaga tgcattgttc ccttgcggtc tggtggcctc cccatcctgc 42660

caagcatctc ccagcttcca ccctagccca ggaggccccg gggggagaga aggaaagcca 42720

tggtcgctc tggtgatgt ttctccatgc ctccgggtgc ctccagggg acaggtacca 42780

cttgtcactg acacacacgc cttcacccac caggcgattt gctgattcac aacatgctt 42840

acagtgttagc ctggaaagt gggcttgc ccctggggca agctgttga acagtaacct 42900

tggagccac gagctgacca agggcctggg caaaggctgc ggggtctgc tctgactgca 42960

cttggtaat aaggcctca gctttacatg tgctctctct ctgttctct aacaggttgg 43020

tggtcggggc cagctgtatc ctttcaagc gtgcaggtgg ccgtcctggg aactggacac 43080

tccttccctt gagtccctcc ctgccacccg ccctccggc aggcttttgc tgccctcaga 43140

tcggcacita ctggcctct cggcgtggag gatctactgt gcctggggac agtttggggc 43200

tgacctctgg ccagggattc ctggaggctc ttccctgagct gggacagctg gacatggcca 43260

tgaggcagct gggctgtcct ccctcaagag cagccccagc ctggacccat tgcttcagaa 43320

gggacaatta gacagggagg gtcaggagag gagctgcagg agggcctggg gtcaagggg 43380

catctgaggg agatgaaagt ccctggccgg ggcgggtggc tcatgcctgt agtcccagct 43440

acttgggagg ctgaggcagg ggaaccgcctt gaacctggga ggcagacgtt gctgtgagct 43500

gagatcatgc cactgcactc cagcctaggc aacagaatga gactccatct caaaaaaaaa 43560

aaaaaaaaaa aaagccccaa gccgctggct gagagcacag gtggaagaaa gcagctgcct 43620

ggcatctccc gtggctgagg tcctccctga accagccact cctctccatc ccaactggaa 43680

tccaccagga tgcagggctc gcccctggagc cgggatggac agcacatggg agcagaggcc 43740

agaggccggc ctagtccgtg ggtgctgctt ggcggctcct tgctaaccctt agcctgtgca 43800

ctttagatgt ggagggtgggg gtctttagtt gggagccctcc tccagggcca gccatggatg 43860

ggtggggtgt gggctgtggc acagggccctt ggggtgttgtt cccatcattt caaaaattgg 43920

gatctacagt gtcctttagc tggcacccca cagatgtggc cctggagtgt gctggcttcc 43980

tcaccggat tgggctggac accaccatca tcatgcgcag catccccctc cgccggcttcg 44040

accaggttgt gctggaggcc ccagctcccg cccctgtggc tctgaggcctt tcctccaca 44100

ccccctcccc aggccagggtgc agtgcagtca tgggccacga gtgatgcctg aatctttaga 44160

gataaccctt gaattggatg aggagggttgtt ccaggaaata tgcagacact cggccggagc 44220

gagggaggag ggtggcagtg gggcgcacag ctgcacagag gcctccagcc gaccacaggc 44280

acagtgaagg gaggctcagc ccagccttgtt gccggcagag caggtcaccc tccgggtcgt 44340

cccattagta agaggccggt gtgtgctgca gaagtgttag ccccacctca gagacccca 44400

actccctgct ctccccttgc ctgtcccctc tgagggaggta ggggtgaaat aagctgtaat 44460

gtgtgagctg gggtgaggga cacagggcag cgctggctcc gagacagccc gtgggatctt 44520

ggcttctgga caggigcgct gtgtacagtgc gccttcatct gtgtctggg tacacacact 44580

catgtggcca gcaggacgag ctccttagatt ggagcaatag agattttctt ttttagcta 44640

aaaactcttc aagggaaagt ctccctgttaa aatagaagtc tggagttgtc attgtggaga 44700

tgtcaaacac tccatgactg ccacgaagga ggccccttgc agggtagct gtgcagatct 44760

gcaggccctg ctacaggicc tcggccgacc ctcagctcac agagcctgag gaggtcacct 44820

gaggtgggag gagccaggcc tgtcatctcc agactccag tgccacccccc aggctgactc 44880

agagacgtgt ccctccaccc gtgtggccat gtgttgtcc atcctaaagc tatggcacac 44940

tcccatcatg tccctcagtg caaaccacc gacccctgtg gtagggacgc agtgtctagg 45000

aaggcctcag agccttcaga tgtgggagg gtgagctggc agtggacgga ggaggaaagg 45060

ggcctgcaga atggggcccg tgcccaggca aggaggatgc acagtctagg cagccaggct 45120

gaggggcgag ggacctgtg tcctggacag gctccatggt tctccctcag agcctggat 45180

ggccatgccc tccaggcctc tggaggggtg caggagtgat gaacagcctg tgcggcagcc 45240

cctctgcagc acagccagcc ctgccccggcg ggccagactc ccacacacgc catctagagc 45300

cagctggcac acccgacacag gtgtcagagg atgttagcag tgactgttt ttccttgc 45360
aaaccagaag ctgtggccag cttcaactgct ggtccgtgca agtccccatt gtcctggaa 45420
cagggcccccc atctgttagct ggacttgggg cgcacaggcc tcctgggccc ggagggagaa 45480
gcaggactct ctctgtccct gatctggacc tgacccctgct gtgcctacat ttctaggcgg 45540
gagcagagtc tcctacacctac ctcctggct cctggatggc agagggcat gttggccaca 45600
tgtggagggg tggccagga gcagggcca tcttgttgc ccagggcaca gtcctgggg 45660
gaaggcacgc ttctctgccat tggtttttag tgaagactaa gtttttggtt ttgtttttt 45720
aaagaaaatgt gtagatgtac caggattgt ttgttttct tcttttttc ttctttttt 45780
tggtttgaga cagagtctca ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca caatctcggc 45840
tcactgcaag ctccacccctcc cgggttcacg ccatttcct gcctcagcct cccagttac 45900
tggaaactaca ggtacctgcc accacgcctg gctaattttt tgtgtttttt agtagagaca 45960
gtgtttcacc gtgttagcca ggatgatctc tatctcctga cctcgtgatc cggccgcctc 46020
agcttctcaa agtgctggga tcacagggtt gagccatcgc acccggcctt gcttattttt 46080
tcttttagag atagagtctc actctgtcgc ccaggctggaa gtgcagtgggt gtgatcacag 46140

ttcattgcag cctcaaactc ctgggcttga gggattctcc cacttcagcc tcccaaaagg 46200

ttgggattac aggtgtgacc gtatctggct gatgaagact tagtaatta gcatctagag 46260

aggagcccac aggctgagtg aatcctgacc atagggccca gggttgagga cttggagcca 46320

ggacaggggc tagacactcc acagagagca agaggacgta gaggcagggg cagggtgtct 46380

caccgggtct tccgcacaga cccctctccg cccttcattt aggccttcga gaggcagggca 46440

gggccagagc ctctctccca cggccacctg gtcttcattt cctgtcttct tgtgcttgc 46500

agcaaatgtc ctccatggtc atagagcaca tggcatctca tggcacccgg ttccctgaggg 46560

gctgtgcccc ctcgcgggtc aggaggctcc ctgatggcca gctgcagggtc acctgggagg 46620

acagcaccac cggcaaggag gacacgggca cctttgacac cgtcctgtgg gccataggta 46680

agggcacgtc gagccacacg ctctgtctct ggtctccccg aggtgcatttgg agaatcttg 46740

ccccacttcc tgtcacctcc cagggctccc ccatcctgct ggctgccagg cgggttggcc 46800

gctccccagt gcacctcgag agcaaccgtg aaggcctgtg gggcggcact cacactaggc 46860

tgtccccatc ttgccatccc cagcaccttgc catctctgctg tgtctccccca ccaccgtggg 46920

acatgctgga aaaaaccaga gaagagactg agacggcatc agccaggtgt cctcatcgag 46980

gatcaactag gcaatcatcc tcgccttccc tggcccttga gcaattgtt attaagggtt 47040

cagcacataa atcctacitg tcaccccca ggittaaatgc ttggatgtt tctttctt 47100
ttttttttt ttttagatg gagtctcgct ctgtcgcccc ggctggatgt cagtggcaac 47160
ctccgcctcc cgggttcaag cgatttcct gcctcagcct cctgggtacg tggggctaca 47220
ggcgccccacc actacacctg actaattttt gtattttag tagagacggg gtttaccat 47280
gtaggccagg atggctcaa tctcctgacc ttgtgatcca cctgccttgg cctcccaaag 47340
tactgagatt acaggtgtga gccaccgcac ctggccagta tgtatttt ctttagata 47400
ttaaatgttt tgctgcttca ggctttccag ctaggttttt ttctttttt gcgtgtgaaa 47460
cagggtctct ctctgttgcc taggaggagt gtgggtgt gatcatagct cactgcagcc 47520
tccacccccc aggctcaatc aatcttccca tctcagcctt ctaagtgtg ggattacagg 47580
tttgagctac tgtgcccagc caagctagtt tttttttt aacataaaaaa tgatatggat 47640
ttgaaagtt taaaaattat ggtgacatac acataacatc aaattcatca tcttaagcat 47700
tttaaagtat atagttcagt ggtgttaagt acgttcatat tgtacaagca gcatgaccat 47760
ccatctctag aactttccca ttatctccaa actgagctct gtcccccatta aacactcact 47820
ccctgctgcc cgggcactca cccttcactg tggatctcta tggatctgac tcctcgaggg 47880

acttcatgt a gtagaaatca tgcagtg ttt gtcctttgt gactggctca tttctcttag 47940

cacaatgtt tcagggtgca tccatgttgc agcatgtt agagtttagca ttgtgttagc 48000

atgtgccagc atttccttcc tgttgaaggc ttagtttat gtgtgtccat tatctgtcag 48060

tggacactt a ggttgcttcc gtccttggc ttttgtggat catgctgctg tgaacatggg 48120

tgtgcacaag ccgcctgtt tcagcacata aaaatgacac agagtttta aagtctgtc 48180

cagccttctc gtggcttca gtgttccc gttgggtccct ttgggcctgg caggtcatca 48240

catgccagga gtggcatttt gcaggccattt ccagaagtca catttcgaag gcttccaaag 48300

acatcacccct tccagtgtcg ggcagaggcc tggcgtttc ccggccaggc gtgggctggc 48360

tacaacttgc tgggcacagt ctggtctcac cttttgtc tctgtcaggt gtaggtccgg 48420

ttttgcattt ggcagtggcc gagcaggtgt gggagtg gacacagcca gggataacct 48480

gtgcccaggc ctggccggg gctgtctgac gggactggca agggcagct ggagccaaca 48540

gggatcgccc agacactgct ctgtccagg cctgtcgag aggaggccat tgcatatggg 48600

ccggccgcaag gagggctgctg ggttctcgatc agggtgggtg gcccacaca cagcatgcct 48660

gctcagatgt cttaccacc tcggtgccctg gccgtctagt ttaggctcct agtttccca 48720

atcaccctgt caacttgcattt gttgaaggcg ggagcaacct agtcagtg tttgttctc 48780

cgaggccctt ctgtgctgag cctggccgt tgtccccgc gagagccaa gatcagagcc 48840
agggtccctc tcagatcacc tgcctccacc tccatcagct aaccgggctt gcgtggggct 48900
ggccaggggt cagtgtctcc tgggggaggg ctcccagagg cacaagctgt gtcataggg 48960
gatgcacttc tgaagcagtc actcgaaatg ggaaatcaga aaggaaacca gcctggagcg 49020
gctgaggcctt cacttttgt cagtggacac aagcgcagag gtgatgaccg gggaggacct 49080
gagatgcctg agcgcacgca gggctcttgg cccggagggt atcagtcagc aagagcaatg 49140
ttctcagcca cgttgtaaaa gtagatttta agtaagttt ttatgataaaa cactacgaag 49200
gattaggtaa cattttggac tctggagtgt actgatggtt ctcatcctaa actccactt 49260
atttttcttt caaaatttat cctcctactg tcattcccaa ataaactcca ctctaaagg 49320
gaggtggcga gtttctccct cccaccgcgc cctagccctc ctccctgtc tgctgacacc 49380
tccgttccacc cacagcataa gggagctgtt gccattgaac cgagggcag ccctcgacca 49440
agcccatagg gatgttagcag accaatgggc cgggggctgt gtcccccggaa agccggggcg 49500
tcagcctggc aggcaacaag cgaggccctt ccctactcag cagagctgcc gtggcctgca 49560
cgcccatcct cccttgctag gagtctgttt tattttttt tactttcaaa atgagcatcc 49620

cccagacagt ctgcctggca tgattgatgc tgggggtgga agctttcac agtccttggc 49680

cctcgaccct gctccccgag ggccggcgccg cttctgcgcg cctgcgtggg gccgctcggg 49740

catgtgctga cttcgctgct gctcagagcc aggttttgta aacattcagg agccacttcc 49800

caggtcagca actgcgagcg tttctgctg gtttgatcga taagccctta accaagctt 49860

atttctactt gcaataaaagg atgatccact ctgggaggtt aaaataaaagc gccctagggg 49920

cggcacagct ggcaatgcca acatctccga ctctgcttcc tgtaccgggt gtgcactacg 49980

tccgcacaag ctgggctccg acaggaaggg gggatgcctc cgtgcccggt gcacacacac 50040

acagaagggg cccaggtgct gcacagagct cccgtgtggg gccgagtgct ggccctgccc 50100

gttgcggcgtg tgccctggcgc ctggccgcag ctggcgagga ccatggacat tggcattgct 50160

aagtggggcc tgcagtctgg aagcagagga ggaccagagc cccttcctcg acgcagcctt 50220

gatctccacg tggtggtta aacatattag cagttaaagc agttaattgc tgtgcagggg 50280

gccccccgctc attgtttgtc tctgaatcac ccgccccacac caggtgtctc agataataga 50340

ctgggaacct cagtgaggag gatttcctgt ctgcagatgt gccgattaca gcgctgagtg 50400

aagacagtca gccagcactg ctgcgggctc gaattcgccc gctgagttaa ccagttgtgg 50460

cctgaatccc tggctgtcta ggggagcagg gccaggctgg ggcattcctga gcaaacgcct 50520

cccaagtgcag gggcttctaa gtgcagttaa gtttagattt ggtttaaag aagggacaga 50580

ctgcctctgg actgcagccc taaaaactg gaagttgaga tttcatgtg ccccttggc 50640

gtccccagcc cctctggatg gttctctgtc cctctcttga gggtgagatg ctgaaggctc 50700

tggcgtatcc ctccctgcac cacaggagtc ctgcccattgg ccagaagagc cagcagacac 50760

aggaggggac tcgctaaacc tgggggtccc acagccaggc agctgttgtg cctgagtgcc 50820

agggaggggtg gccacaggc tgcctgggc ctgtgatat ggcaggttag acgagaccca 50880

gggaaggaat ccgtctggat cttacccag ccactgaagc tatttcctt ttggcttta 50940

tcttagataa ctcagagatg tccacctgtg tgtaaaccag catcagagcc taaaacacaa 51000

catgcatgga gcatgggagc ttggcttccc ggcttcctct tggcaccaca cagaggccac 51060

ccccacagcc tgccctgtta tagtctcccc cacgtggcac gtgtgcctgg accacagcca 51120

gagagactgg ggtgcccagg agatgtatgtat gggggctggc ggtgcccagg aggggagctg 51180

ttgccaggg gggctgcagc cctggctcc tctctccacc caggcactgt ttgctggcat 51240

gtacacggca ggcaactgtc ttgtcagc tggtcgcc tggatggctcc cgtacaccgc 51300

agactcagct acacaagtcc ctgcggattt tccctctgtt gagtgccagg cagcaggaaa 51360

gggcagaaag caagaaccaa gctgggatg ggtgggagca tcctaagcct ggtgagagg 51420

aaggggcggc tcctcctgga tgccctctgt gctggtgtgg gtgcagctgg ggcttagggg 51480

ccgcggtggtt tggttatgt gcccggcga gggggctgcg gtggcccat caggactgt 51540

ctcagggatg cgcccttgctg cagctgcgtg aaaccaagtt tgtggctatg ctctccccgg 51600

tggggatggg cccagcagtg accctggcat ccacatgcct ccatgctctc agggtggagt 51660

ggccatccct gagcaggtga cacggatcgg agggccctct ttgatagtct aacaccttt 51720

tattttatgt caaatttatgt ttgttaattaa tgacatcaag agagacccaa atctgcctcc 51780

attgtgagtt tgatatttt tgaagtgggg ccaagatgaa cattcatgga gctcttccta 51840

tgagcggtgg ctgcggccctt cccctccaca ccacgtggcc cggggcgtgc gctgtcgctc 51900

ctgagacagc actgttggct cagcccttagc tcatggtggt gctaaacacct cacagaggcc 51960

aggccagagt agcaggaggc agcgccctgt gcttacccac cagcctggtg ccccacgctt 52020

ggcttgaggg ctatgttaca cttatgtcca gagcccacag ctatctgaca ggccagccgg 52080

cacctgcata catggttgtc caactgggtc ttgttaccat gacaaattca gtacttaatg 52140

attagaactg agtggaaacc aattaaaaaa aaaagaacaa catggtgaaa agtcttctag 52200

agataggta gcaccattta tgcatattac catgcaccct ctaatgtctg caggtgcctt 52260

ggggcagcca acctgttaca attgcaatta tgtaacaat tgtaaaggg ccgggtgagg 52320
tggctcatgc ctgtaatccc aacacttgg aatgccaagg tgggaggatc atttgagccc 52380
aggagttcaa gaccagcctg agcaacagag taaaacctct ttcaaaataa ttaataataa 52440
taataataat aataattgtt ttttgttgt ttttagacg gtgtctagct ctgttgccca 52500
ggttggagtg caggagcgcg atctggctca ccgcaacctc cacccccga attcaagcga 52560
ttctcctgcc tcagccttcc aagtagctgg gattacaggg acccgccacc ggcgccagct 52620
aattttgtt aatttttagtag agacagggtt tcactgtgtt agccaggctg gtctcgaact 52680
cctgacgtca tgcattccccc gcctcagcct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc 52740
actgcacccg gtctaataat aactgttaaa gcaataatga ccactgcca cagagcacgc 52800
tccttcctgg gggcctctg ggcctgagct gggggctgctg ccgtactcca aggctgactg 52860
tgggtctta cacatataa tgcacatagg cagcttgagt aggaaaggcc ctatgtcgc 52920
ctgaggggaa gctcacccca cccccaagg agccgcccctg ggtatgagac atccctggaa 52980
cggcctaagg ggtccctgggt ggctgctggc agtcacagca agtggccaat caggtcccat 53040
tgaggcccaag gggctcactc atttattcaa ctaacatggc gtctcgatgg gacctgaggc 53100

cagcaggcga ggtgcgtccc cttcccttg gtgggctcat agctgcgggt aggggccgg 53160

ggctcattga gaaggtgcga ttccagaaaa aaaaaaaaaa agaagataaa tatttaaaa 53220

taataagctt caagaatcta agtccagttc caaaggcata cgctcctctg tgccctggtcc 53280

aagggtgcctc actggggcaa gtggcaggcc aggccccgtg agggtgtggctg gctctgggg 53340

ccacatgcct catgagacag tcgccaggtg gcccacaggg cctgtgtgt aagccgtgcc 53400

cgcctcgcat cgcccaccgg ccctggagcc tcccactccc acaccctcgta ctcaggcgc 53460

agtgccttggc cctggctgcc tctgtctgga tcacagccac tggctcaccc tgctgtactc 53520

ctgctggcac ttacctctca cctggggcgc tgcctccttg ctcttcctt gggaaaatgt 53580

gtccccaggcg ggcgtgaaat cagagggcat gcctgttctt cccatcatgg atgagagagg 53640

cgcatac tgcatacgcc tggccgtccc cgtgtccctg tgtccatcag aatagatggg 53700

agtgacccat ggtgactgtg tgggtggttt ttggcttca gccttcctg gtccctcctt 53760

ggggccaggc tggctggaca agcatggtg ctgcctcca tctcctggc cattgacagc 53820

agctgggtgg gctctcattt tgcatacagg agggtgcggc tgcacggctg ttcctagcac 53880

tggccacaca tggagatggg ctgtccctgcg tcaggggtgc tgcactgctg ggcctggggc 53940

tggaggcagc tccgggctgc agagatgctc agcccagtgc ttccctgagtg tcagtgtgt 54000

ggccagcca cacatataca taggaagtga gcacgtccat ttgtacctgg aattactatt 54060
tttggcag aaggacaaac ttgttggc ccatcagccc caattctgaa ccaagtccag 54120
tggcagcaa tgagacccac ttgctacca gcagagacat ctctgcagtg gcaggttcgc 54180
caacgtgcca gtggttgcca tctctgaagg gacgttcctt gggcttgcg gccatactct 54240
gcaccatggt cagcagctct tccttcctt atatgttagtg ggcatggcct gccttcagga 54300
tggctggtca gttcgccac ctctggctcc cacattgacc acagctctgt tggctgagat 54360
gatcctcttg gagggcagct tcatgtaagt ctccctggtt tccggctag gggaggtgac 54420
tgcggtag ttctcaaagg cccaggctaa caagttccag tctcagcctc tcctccaggc 54480
agcgcttigat ggtacaggtg tggtgccctgc agggaggacg ctgccgacgt ccagctggc 54540
cctcttgcta cagtacacaa acagaaattt gcccgtgtgg aggcccttgg tggtgatgga 54600
cagctctgtc tgctgcttaa actggtgtgg atccctggaga ccatctcagc aggggcattgt 54660
ccttcaaggt gcccttgatg tagctgtgcc gtcagctaa gtccacagca tgcaggccta 54720
tgagccctcc tgcttcatgt gcacaaggaa cacagagctg gtgccttcc tctgcccacg 54780
aatcccgtagg cccacgactg ctcatgaata cagcctgaag agctgtaccc ggaattttaa 54840

tgcccttgtc gttgcagaa aatatgccag agtgcatagt atccattacg taataagctc 54900
ttacaaaagaa ggaacatggta gaagatgcct ataaatggat gagaaaaggc aggaactggt 54960
aatttacaaa agaggaaata cagttcataa acacgtggcc aaaaattact tcattttact 55020
agtcatcaaa gaagtgc当地 ttaaaggcagc atgacagaga gtgctgtgcg ccgc当地gccc 55080
caggaaggaa cagagtctaa ggactgccc gc当地ccagaa gc当地ccactc agctggccgc 55140
ccttc当地tttgc当地gggtctgcc ccaggaactc aactgacaca tggcaagctg gt当地ccccagg 55200
tctccatcct ggiggtgtct aggaaggcaga gc当地ttagagag tgc当地tgcct accccaggag 55260
ggccattca gcagcacttgc当地aaatgctg cactggcac tccagagcca aggcttc当地g 55320
gacggagctg cagggagcac agagccgccc catggggagg cctgc当地tgg gccacaggca 55380
cagctggaa agctctgagc acaacatgca gggcgaaaga caccggigca ggc当地ccctc 55440
tttccctaaa tggc当地tgaat agtgc当地tgcatt tatccctggca taggaggaa atggc当地ggga 55500
gctgaccagg cacaactgct ttatccctggc ataggaggaa aatggtgggg agctgactgg 55560
gcacagccac ctgc当地tccctg ctgctcacag cattc当地ggcc ccagtggtc cccaccttgg 55620
cacaagtcgt ccaacctcct gcagggctcc aggc当地tgc当地c cagtagggcc taggacgc当地t 55680
gattggctgt ccagcaccag cagggagatc tggcccttct ctggccactg cccagtc当地t 55740

tgctcagcaa gacccatagt ggggctcagg gcctgggtgc ctgccatcatggctggccac 55800
ggcttagggac gtggccccac ccaagtgagg ctggcccttt ccctgcaccc actcccagcc 55860
acgtcccacc agcccagctt ctaacccac tgtgccctcg gctgccctcc tcagggctga 55920
gcctgctgcc tgccacaggc cactcactct tcctttgctg ttcatcccc aagggctgtg 55980
gagtccctgc agggccaggc gtgtctgtgc cgcgcagccc actctccctt ggccatccag 56040
cctgtccagc tgcacatttc tggctccatt acattccac cgacttccca 56100
gagtgatcca cagagcatgt gcggaaagagt cctggctttg gatggccac ctattccat 56160
gcctctttta tcttttgta ctactttaa atttatctt atttccttcg ggacctgggg 56220
acagggtttg gtcagcacct gcaaggcttg tagttccat agtgcctat ttaccatgag 56280
gaacatgatg agtgctttg gcttccagg accagccagg caagcgtca gaggagatg 56340
tgggtgcagc gtcagatgtt ctgttccggc acggaggcagg caccaggaag tgctggccct 56400
gggtggctgg acaccaggtt ggagagggac cagacggctg agcgtgagcc cccggccctgc 56460
agggaccaca gccccctcctt cgtgccccag ccctgccccat gggcccccagc tccttccct 56520
gatgtgggct ggcacccctt gtgtctggc tgatccccga ccggtgccag ccctccccggc 56580

acccaattcc tgccgtgag cagagcacag aggctggagc cgccctcccg caagctggct 56640

tagccaagtt ggtatgttt gactcctgcc ccgggacagc agctggagac ttaagggttc 56700

cctctcacgg gagcttcagc ttccagatgc ttagtgtggc gccacccgca taccggccag 56760

cagctggttt gtcccagcca cgtatgagcag gggagctatg ctttttaggc aaaattgcct 56820

tcgccatgg tggatcatcc tgagccccctg ggagccgaga gcacctgggg ttgggaggga 56880

aaagctgctg tggccatccg ctggccgtgc aaaatcacac ccatctgagt tagggagaa 56940

agggacctct gctggctgtt tggctatgaa gaggcccatg cggtgccctc tctccgggcc 57000

ccaggctgtg tggagactgg cagggggcag ctgtgctgac cccctggact ggccatcccc 57060

tgcctcttt ggccttgca cccaagagca ggatcagctg agccagctgc cccctagaat 57120

gggcacggtg tagtttggac actgccccctt agctcagctc cccttggccc tgaggtctct 57180

aggctggac tgtgtgccag gcagccacga ggggctgcag cacagagcag gtgggagacc 57240

cggctgctag ctctgctcac ctggccctct actagcgggt tacggggct tgctttctcc 57300

taatggggag agaccccaa gccctacctg ggcagagggc cagatccag gacttgagca 57360

ttgttgggt acagtccagg gtgtggctgg ctccctttca gcttgtccag atagggagga 57420

ggccattggg agccagcagg tgtcccttga aggaggcccc tctggactct tgaggcctgg 57480

gagctgatgg atctcaactgc ctaatggtat caggctgtgg tgctgcagac agatgcaggg 57540
 aggccaggca ggccagggtgc caacagctcc ccatgaaggg ctggtttctc cggatgaagt 57600
 cagtaccaga gccactggca ctgtgcttgtt gcccctgcag cagggccitga ggcctggca 57660
 tgcggaagat tctggagtcg cgcgcattgc acitcttgat gtcagggagc cccagcattg 57720
 gcaagtgcctt cttcccttcc cgcggtccag gaaccagtct aaggccgact ccagttcca 57780
 ccgggtggcac ccctgccttg tctccctgtc cgctgtcat ctgaccagtg tccgtttcag 57840
 acctgcctgc caccctcgtc agaggccagg agccccctcta cgctgcttgtt gcttcacatt 57900
 tggccagttc taagtggaca ttctttttc ttgagacagt ctcactctgtt cggccaggct 57960
 gaagtgcagt ggtgtgatct tggctcaactg caaccgacac ctccccgggtt caagcaattc 58020
 tcataccctca ccctcccaag tagctggat tacgggtgca tgccaccaca cccagctatt 58080
 ttgttatattt taatagagac agggtttctt tctttcttt tctttctttt ttttttttg 58140
 agacagagtt ttgctcttgt tgcgcaggct ggagcgcaat ggtgcattct tagctcaactg 58200
 cagcctccac ctccctgggtt caagcgattc aacctccga gtagctggga ctatagggtt 58260
 gcaccactac gccttaggtaa tttgtatattt ttagtagaga tggggtttca ccatgttggc 58320

caggctggtt ttgaactcca gacctcaggt gatccacttg cctcgccctc ccaaagtgtt 58380

gggattatacg gcatgagcca tcacgccctgg ctgagacagg gtttcatcat gttggccagc 58440

ctggtctcga actcatgacc tcaggtgatt tgcccacctc gtcctcctac agtgctggaa 58500

ttacaggcag gagccactgc acccggtctc taagtggaca ttctgagaaa cagtttaaac 58560

acaaccgctc taggtcaaaag ccactgaaga taaccttca gccccctctc tggcccttc 58620

aggtcgagtc ccagacacca gaagtctgaa ttggagaag gctggggtag atactagccc 58680

cgacactcag aagatcctgg tggactcccg ggaagccacc tctgtgcccc acatctacgc 58740

cattggtagac gtggtaggagg tacggcatgc gtccgggac cagggccctt gcccctgcct 58800

gctccaccac ccctgctcgc tggctccgg ctgctgccgt cctgttaggag agaaacgaca 58860

ctttctctga tgacagagggc tctggccaa accccagggc cagccgtct ggagtctgg 58920

ggcaacctgg acatggccct cggctctctg ctttcctt ctttctgtg gtgggagtgt 58980

ggatggctta aagacagctg caagcaccag cagcagacgc ctgctggaa tggggcatgg 59040

gtcagctctg cacgcaggcc tcaaccctg gcaggttaggc tagaggcata ggcttagaaa 59100

tgccaccatg gccttgggc cgtccgtcc ccacagggtt gagaggcagg tctagttcgg 59160

gcccacctgg cccgccttc cccgcctcag tatcctctgg cttgcctctc tggcatcac 59220

accggggcag gtccttgct ctcaagctgct gctgctgctg tgaagtggag accggtgcca 59280
gtctttcctg gggtggggct ctggagccct ccttacacat ggccccagta agggactgtg 59340
gtggtcagtc ttgggatact gcaccctggc agcctcagga gtgctcgcc tgtcctgcat 59400
gtgtccagca cctgctgctg aaagtggctc tggagggtcg ctgagagctt ctttgtagcg 59460
agacctgtca gtgtctgcgt cctggggctg tggtaaaaa tcaccacaca cgggtggccc 59520
agaacaacag acatggatta tctcacgttt gggggcagt agtctgaaat gaaagtgtca 59580
gctggggctg ggtgcagtgt ctcatgcttg taatcccagc actttggac tccgaggcag 59640
gcagattact tgaggtcagg agttcaagac cagcctagcc aacatggtga aaccgtctct 59700
actaaaaaaaa tacaaaatt agccagggcgt ggtggcacgt atctgtaatc ccagctaccc 59760
gggaggctga ggcaggagaa tcatttgaac tcgggaggag gaaggcggag gttaccgtga 59820
gccaagattg tgccactgca ctccagcctg ggtgacagag cgagactcca tgtcagaaag 59880
tgtcagctgg gccaggctcc ctcggaaagcc tctggggtag gatccccag gcgtccctcg 59940
ggttgtggct atatcactcc tctcictgcc tcatcgicat gtgacagict cctgggtgtg 60000
tctctgggcc ctgatttgcc tcttacagtt tctctgcaat tggacttagg gtccacccta 60060

atccaggatg acttcatttc catccttacc ttaattgtat ctgcaaagat citatttcca 60120

aataaggta cactctgagg ctccaggcag accctgcagg gtcctgttagg gcccatctag 60180

ccgaccggat tgggtggaca gagcatgtgg ctccatgtgc cttagccacc ctgcagcccc 60240

agcttgctta gctggatggt tcagctgctc agtgatttct gcaagcgcag cctctgcctg 60300

tggaccatgt aggtgcagtgc tctctggtt gcagggctcg ttgaatcctg tggcgctgc 60360

accctgagac agtgccatgt gcatctctgt gcacagcggg aagcctccct tctgtctggg 60420

aatctgagtt tccctctgc aagtgtgtag ctcccaggct cctgtgttgtt aaactgaaac 60480

atttcaaacc gtttgccag aaatgcatgg cgcacacaaa ggcattctt attaaacat 60540

taaatccact ctgtcagaaa ggtcggtctg aatagtccaa agagtttaca cccaaaccagt 60600

ggtcccttga gcggctggga agagcctgtg ggccggggcgg gggctattgt ttaatgagat 60660

gttgtgtgct gtgcgccgccc cgccgggatg tttccgttagt tagtcaggcc tgctggaatg 60720

cgcaggctgc gctctgagtt tatctccacg gatctctatg catttctgga atgccaaaca 60780

acatctgcat ttcctgctgc catggtgatt ggcagccat cccagaggac ggtgctggaa 60840

cccccaaggc tgggcacacc ctgggacgga gggatctcca gcacagcgcac attctgattt 60900

ggaatttgtt atggactgtg acgtgcagat caagctgcac gtcaggagca catggaacgc 60960

tttgggtcc ctttttagcc ggggattcca gtgaatgaaa acggtagcag gggctcttt 61020

gagcttggtc atggggcagc cctccgaggt cagcaatgtg cagaagggtt ttggagagaa 61080

ggcttgagca tgtgagggtg gcacggccag cctcatcagc agcggactcc tttcccaggg 61140

cagagtggag ggcagcaaac aggagaatga gcaacctacc taggtccttg ggatgccct 61200

caggaggacg agctctaggg ggaatgctgt acgtcaccat gctcggtgcc agtgttgggg 61260

attttctaaa gggagatgcc cactcgagg gcaaagggtg atggcatagg ggctgcata 61320

aaccccgac atggtgctga cgtggccccc ctgtgccttc cccaagggc ggcctgagct 61380

gacacccaca gcatcatgg ccgggaggct cctggtgca cggctcttc gcgggtcctc 61440

agatctgatg gactacgaca atgtgagttc tctagcagga cgcacgtgc agcctaggac 61500

aggctgagtt cgaggctagc tcttcgggg tgagggcct ttgtgcgtg tgtgtctgca 61560

tgttagatgtg ggcatgcgtg tgtgtgcgt tatgtgggtg tttgtacac acgtgtgt 61620

gcatgcatgg gtgtgtggct cagttctgag agtgtggcgc aggctgggc aggtgggtcg 61680

cctactgtgc ttgcagcctg ctctggcgc atctggcctt ggtctgtat cgctgcctt 61740

tgtgtcacat gcagtggga acttcggttt tcggggccca agggccctcc ctgactccag 61800

acctgcttc aggttccac gaccgtctc accccactgg agtatggctg tgtgggctg 61860

tccgaggagg aggcaagtggc tcgccacggg caggagcatg ttgaggttag gcctgggagc 61920

agcacagctg aggacagtgg cgactccacg acctcacccc atgcctggg cggaggcctt 61980

gtgagcaggg tgccaaggtc tctccttcc aggggcccctg agcagtggt gtgttagcg 62040

ggaagggaca cgttggggc agcctcagaa gtgggggtgc ctggctttg gcagccttgg 62100

ggtgactggg cttaggtgcc tctggctct gccaccatgt gtcacagcag tgagggaaag 62160

gcccttggct gccttgttct gagggcaagg agaagccctg tggcccagaa gcccccagcc 62220

ccaccccagc catgtgcag gggtgccca caccagcagg gtcaccacca cggtgccacc 62280

cgcctccctg ctgaggtcag ctgagcactg gccccactcc agcacacagc agcttgtccc 62340

tgaaagcacc agggccccga agatgcctct gtgctgtccc caccttgcag ggccatgaat 62400

ctcactctac ccagaaaagt ttctccagg ggcctccgac ctctgcttcc acccccaccc 62460

cccccaccac cctgcacctc gtcttccctgg actgcccagg gtttctccca ggccgagagcc 62520

ccccgcccccc cgccccccac cacatcctga tacccatcct cttccagctt cttccaggct 62580

caggcactca ccctttagga aagggtttt catcgagcaa gcctgcttgg 62640

ctggcaggta gctgtggctc cgggggtggcc tggagggatg cggggctct gaagcctgcc 62700

ggccgttgtt agctggaagc cttcggtgcg gttcatctt gctgccgctg cagcttgca 62760
gcacccagag aaaccggagc ctgcagccctg ggccgtgggg cctgcggcct ttggggatga 62820
gacactggc tccagggctg gccccttccc cctgcaccccc agaactctcc atcaacagga 62880
cgggcctgac aggccagcct tccccgaggc acitattttt ctattttgt ttgattcatc 62940
acaagtgtgc tggcacatat gttcctggca tttataatg ttgtttatg tttcacaaatg 63000
ttgaatggcc aaatactctg tttgtttct ttcaattct gtcttagtta gaacaatatt 63060
ctctgaagtt ccattaatta ataatggctg tacagcacat gtgagggccc cactcatttt 63120
ttacttggcc gcagccccgg acacgctgac gagcccttca ggggtgctga aagccttgt 63180
ccaacagctc cggctccggc gtggccacag cggccttgct ccagttaggg ccaagcaaac 63240
accagggtgc ctgagggagc ccaggtggcc tcctgctcac ccattttgc ctccaccatt 63300
tgttgtgggt gagctacgtc cacccaggtt tgctgtgcct ggccgtggctg ctggatgc 63360
ctgatgcctg ctctgctgct gtggtttacg ggggtcccag gcctgggtgg gacagggtct 63420
gtcctgcaga gcatggctcc agccactggc tgcctgcacg tgagagggcc tgcacacacc 63480
ccgtggccag ccaagccctc atccccatcc cagaccagac cttcaggcca gatggatgg 63540

tccgtccccgc catgaccctg ccttgcccat gcagcctgtg ggagctgcag gtgccacgag 63600
gtttgttgt cgca gactg atccagggtt ggtatcctgt ctcagggtct atcacgccc 63660
ttataaaacca ctggagttca cggggctgg acgagatgca tccca gttt atgtaaagg 63720
gagcatccct gtggccagg gtgctgagga tgagagggag ggtggcaaag agcctggcag 63780
ggtaaacacc cgaggactgg ccccacccat gcctcccagg cagggtgcag ggtggatgca 63840
gggtggacgc aaccaggccc cctccctggc tggggctgca gatgtgcggc ttccatgg 63900
tgtgcctgag ggagcccca cagctggtgc tggccctgca ttcccttggc cccaa cgcag 63960
gcgaaggttac tcaaggattt gctctggga tcaagtaagt cccgaggaat gcaggctgca 64020
atgcgatgtc cagctggta tccctcgagt gccggcagtc ctacagtgg a gactgctgc 64080
cactcttgcg gcatttatgt ggccttcgtg gtttgcagc agagattcct caggcccctc 64140
agacagggcg gtttttaggg ggacaagagg cggttctgcc ccagccagac gctgttgagc 64200
cagccagagc caggtgaggt gtccctgtg gccccgggtc gctgcttaggg cccttgc 64260
cctggccaag caccacgcca ccatgagcag agtgccagta cctggagagc caccggcagg 64320
ctgctgtgtc tcttctggag ctggggccat tgcctgggtc ttgggctcag gctgtgttt 64380
ttcggggtcc cgggtcaaa ggaaggccatg gcaaaggctc tgggtgggtt gacagggta 64440

gttggaggtt gggacattgt gcatggcctg agagaggtgg ctggctggat gtggggcctg 64500
ggaggtggtg gtgtggtgag gccaggatgc gctgtctgtg gtaaagcag agagcagagg 64560
cctaaggcag gactgtgcct agcaggggag gatggaacag caggaagcca ggccagggca 64620
agccagggcg tggctggtg ggaggtggc tggacgagca ctaggcatct gctgggaggg 64680
agggtggatgg cacccacggg tggtggcagg ggtcctggct gctggctggg gtcagggga 64740
cagtgaggag accagcagcc tctgaggccc tcctttccc ggggtggta tgctgtggac 64800
ccccctccct gtgctgaccc cgccctgcctc ccccatcccc catgtgcagg tgtgggctt 64860
cctatgcgca ggtgatgcgg accgtggta tccatcccac atgctctgag gaggttagta 64920
agctgcgcat ctccaagcgc tcaggcctgg acccccacggt gacaggctgc tgaggtaag 64980
cgccatccct gcagggcagg gcacacggtg cgcccgccgc cagtcctcg gaggccagac 65040
ccaggtatgc aggtgggct ggctctgttt gaggacaggg catgtggcag ggtgcagga 65100
gccctggcca tggctccct ccaggtgtac agcaaggcta cacctgccac gccacccaga 65160
atgggtgctc catcctgtaa ccaggccaca gcggtgacag gcagaagggg aagttccag 65220
gggccccaaac ctccccgggg gacccagac cccggcctgg ccacagctgc tccccacaca 65280

caggaggat caagaaacgg ggcicatcct tagcagccia tcccaggigg aigttggcgt 65340
ggaagggtgtc ccgggtgggc taaagtcggg catctaagt tgctgcccc cagggggctg 65400
cagtcggaa gctggctcc caccgaggcc tcccaccaag gcctggctcc tgcagagttc 65460
agcgcccgct cattcccta tctccagaa ggtggagacg ctgccctgtg atggccggcc 65520
ctgcccagcc tgccctgcac atctgggtct gtccagctc tgcagagcca ggctgaccgg 65580
ggggcatgtt ttcatcggt acctctctg gggaggaaga aactggcaag ggctcctggc 65640
ctctgcccc gggatgcctg tgccagagcc ccctcgccctc gtggtcta atgtcatcct 65700
ccggcctggg ctgcagggca gggccgggg cagggtgggc cctcagcccg tgccatccag 65760
cccacctggg gcaccccat ggctgtcagc ccctcccagg gttgggtgt ttgggctcca 65820
tctctccccc gggctgagg tggagaccag gcagagcagt gggctccccc caagatgcct 65880
gtggacagggc tctagggtct gcatggcgcc gaggggctct ggggaggcct ctctgggggt 65940
actcagggcc ccctgcttca ccgtggccgc ctccccccgg cggggccgcg ctcgataggg 66000
ataaacaaag ggcattctga ggaaactctt atcagaacat tacacctccc agagctgttt 66060
tgttaggagc ctgtataaaa tttttatcat ttcaaaaatat tttttagca ccgcgtcgct 66120
ccctgtgacg catgcctcg gggtgggcc attctctgct gggtttattt ctcacccatc 66180

tcccttgggg gtccctgggt gtggcagtgg gagacatagc taggctgatg tgaggggtgg 66240
gtggctgacc tgtgctgacc ttcctgttgt tggcaggatg gctgcaggcc aggtttgggg 66300
ggcctcaacc ctctcctgga gcgcctgtga gatggtcagc gtggagcgca agtgctggac 66360
gggtggcccg tgtccccac agggatggct cagggactg tccacccac ccctgcacct 66420
ttcagccccc gcccgggc accccccca ggctcctggt gccggatgat gacgacctgg 66480
gtggaaacct accctgtggg cacccatgtc cgagccccct ggcattctg caatgcaa 66540
aaagaggta cttttctga agtgtg 66566

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるTxRII α と、公知のTxRとのアミノ酸配列のアライメントを示す図。

【図2】マウス抗TxRII α 抗血清を用いたウエスタンブロット法による各種培養細胞株におけるTxRIIsの検出結果を示す写真。

【図3】各種タグを融合したTxRII α 組み換え体のDTNBアッセイによって測定したTxR活性を示すグラフ。縦軸は412nmにおける吸光度を、横軸は反応時間を示す。

【図4】各種タグを融合したTxRII α 組み換え体のインシュリンアッセイによって測定したTxR活性を示すグラフ。縦軸は340nmにおける吸光度の変化量を、横軸は反応時間を示す。

【図5】 TxR活性阻害剤がflag-タグ融合TxRII α タンパク質のTxR活性に及ぼす影響をDTNBアッセイによって測定した結果を示すグラフ。TxR活性阻害剤には、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)と13-シス-レチノイン酸を用いた。縦軸は412nmにおける吸光度を、横軸は反応時間を示す。

【書類名】 図面

【図1】

1' MAVALRGLGWRFRWRTQAVAGGVVRGAARGAAAGQRDYDLLVVGGSGLACAKEAAQLGR
 1" MNGPEDLPKSYDYDLIIIGGGSGGLAAAKEAAQYGK
 FAD結合領域(ADP)

61' KVAVVVDYVEPSPQGTRWGLGGTCVNVCG C I P K K L M H Q A A L L G G L I Q D A P N Y G W E V A Q P V P H
 37" KVMVLDFVTPTPLGTRWGLGGTCVNVCI P K K L M H Q A A L L G Q A L Q D S R N Y G W K V E E T V K H
 還元活性中心

121' DWRKMAEAVQNHHVKSLNWGHHRVQLQDRKVYFNIKASFVDEHTVCVGAKGGKEILLSADH
 97" DWDRMIEAVQNHHIGSLNWGYRVALREKKVYENAYGQFIGPHRIKATNNKGKEIYSAES

181' IIIATGGRPRYPTHIEGALEYGITSDDIFWLKESPGKTLVVG AS Y V A L E C A G F L T G I G L D
 157" FLIATGERPRYLG-IPGDKEYCISSEDDLFSLPYCPGKTLVVG AS Y V A L E C A G F L A G I G L G
 NADPH結合ドメイン

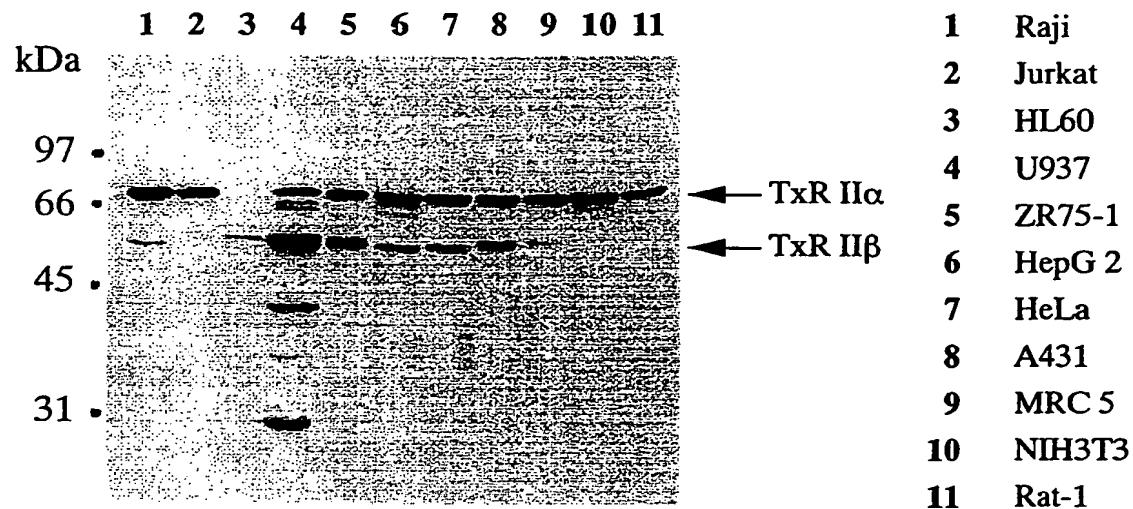
241' TTIMMRSIPLRGFDQQMSSMVIEHMASHGTRFLRGCAPSRVRRL---PDGQLQVTWEDST
 216" VTVMVRSILLRGFDQDMANKIGEHMEEHGIKFIQFVPIKVEQIEAGTPGRLRVVAQSTN
 298' TGKEDTGTFTDVLWAIGRVPDTRSINLEKAGVDTSPDTQKILVDSREATSVPHIYAIGDV
 276" SEEIIEGEYNTVMLAIGRDACTRKGLETVGVKINEKTGKIPVTDEEQTNVPYIYAIGDI
 FAD結合領域(フラビン)

358' VEGRPELTPTAIMAGRLLVQRLFGGSSDLMDYDNVPTTVFTPLE Y G C V G L S E E E A V A R H G
 336" LEDKVELTPVAIQAGRLLAQRLYAGSTVKCDYENVPTTVFTPLE Y G A C G L S E E K A V E K F G

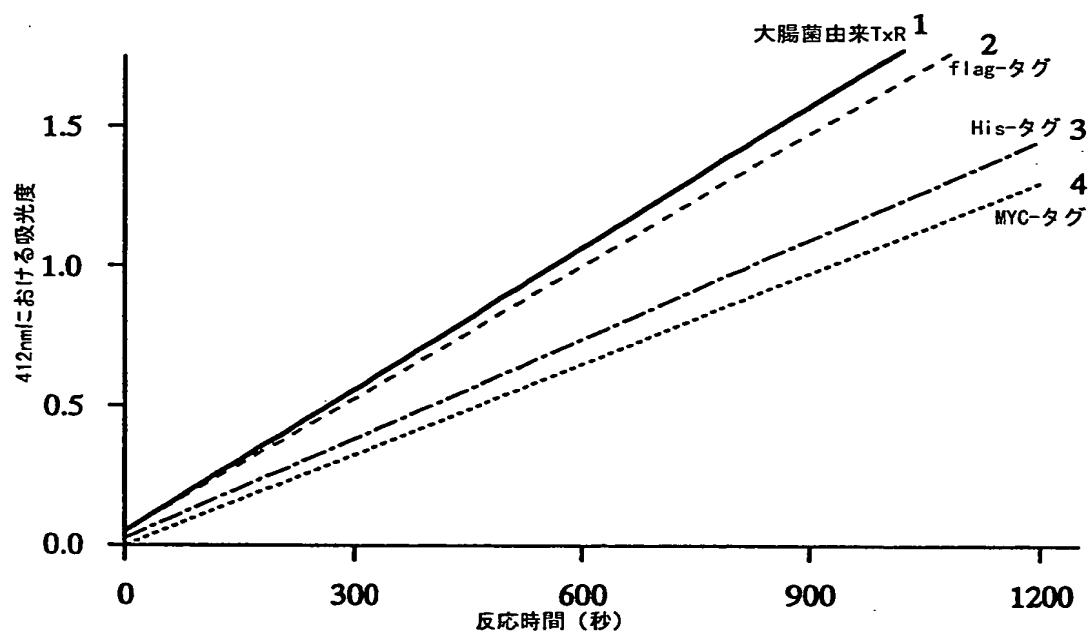
418' QEHVVEVYHAHYKPLEFTVAGRDAS Q C Y V K M V C L R E P P T A G A G P A F S L A P T Q G E V T Q G F A L
 396" EENIEVYHSYFWPLEWTIPSRDNNKCYAKIICNTKDNERVVG-FHVLGPNAG E V T Q G F A A

478' GIKCGASYAQMRTVG**I H P T C S E E V V K L R I S K R S G L D P T V T G C S e C y s G**
 455" ALKCGLTKQLDSTIG**I H P V C A E V F T T L S V T K R S G A S I L Q A G C S e C y s G**

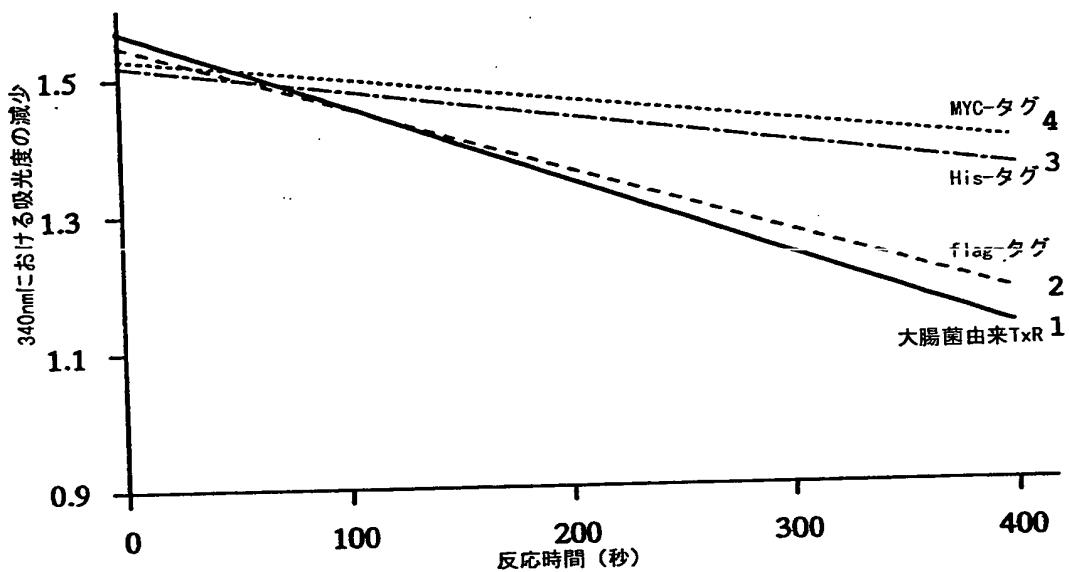
【図2】



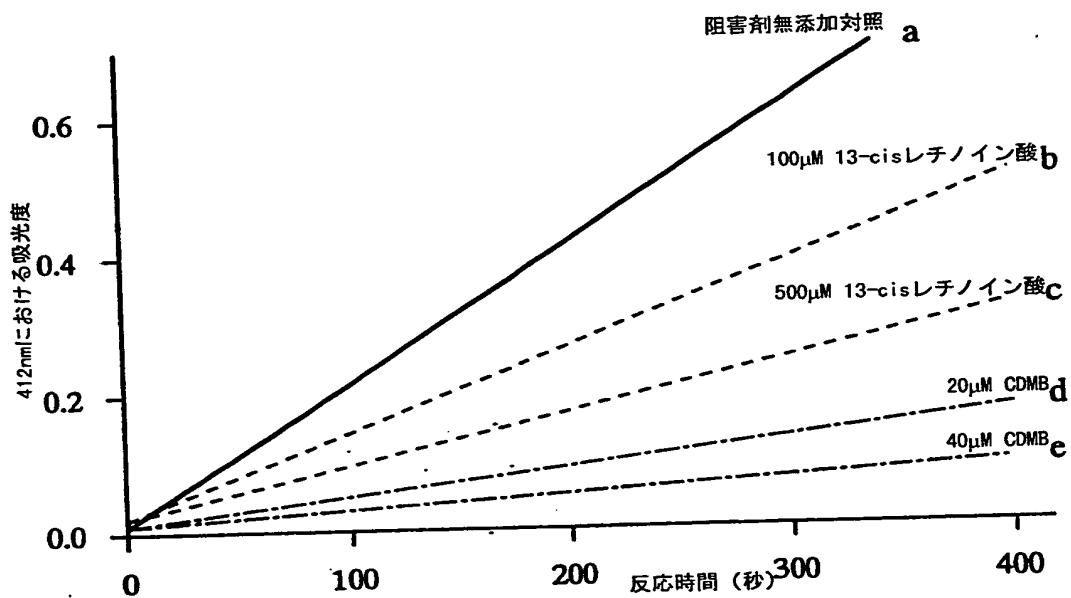
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、ヒトにおけるアポトーシス阻害タンパク質XIAPの結合タンパク質とこれをコードするcDNAの単離を課題としている。

【解決手段】

XIAP結合タンパク質、ならびにそれをコードするcDNAが提供された。チオレドキシンレダクターゼ活性を持つこのタンパク質を、チオレドキシンレダクターゼII (TxRII)と名づけた。更にTxRIIにはオルターネイティブスプライシングによるサブファミリーTxRII α 、ならびにTxRII β が存在することを明らかにした。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 390004097

【住所又は居所】 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友
商事丸の内ビル5F

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

出願人履歴情報

識別番号 [390004097]

1. 変更年月日 1998年 7月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内
ビル5F

氏 名 株式会社医学生物学研究所

